



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

EVALUACION FUNCIONAL DE LAS PROTEINAS TvCKs1 y TvCKs2 DE *TRICHOMONAS VAGINALIS*

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA:
MÓNICA SARZO GÓMEZ

TUTOR PRINCIPAL
DRA. MARÍA IMELDA LÓPEZ VILLASEÑOR
(INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. GLADYS FRAGOSO GONZÁLEZ.
(INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM)

DR. ROBERTO CORIA ORTEGA.
(INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM)

CIUDAD DE MEXICO, OCTUBRE, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Evaluación funcional de las proteínas TvCKS1 y TvCKS2 de *Trichomonas vaginalis*.

Reconocimiento

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Imelda López Villaseñor, en el laboratorio B137 en el Departamento de Genética y Biología Molecular del Instituto de investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Imelda López Villaseñor (Instituto de Investigaciones Biomédicas).

Dr. Roberto Coria Ortega (Instituto de Fisiología Celular).

Dra. Gladis Fragoso González (Instituto de Investigaciones Biomédicas).

Se reconoce y agradece la participación técnica, asistencia y asesoría de la M. en C. Karla López Pacheco durante el desarrollo y trabajo experimental de este Proyecto de maestría.

Se utilizó el servicio de secuenciación de DNA del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, el cual fue realizado por la M. en C. Patricia de la Torre.

Este estudio de maestría fue apoyado con una beca para estudios de posgrado de tiempo completo otorgada por CONACYT.

El jurado de este estudio de maestría estuvo constituido por:

Presidente: Dra. María Soledad Funes Argüello (Instituto de Fisiología Celular).

Vocal: Dra. Ana María Cevallos Gaos (Instituto de Investigaciones Biomédicas).

Vocal: Dr. Julio César Carrero (Instituto de Investigaciones Biomédicas).

Vocal: Dr. Abraham Landa Piedra (Facultad de Medicina).

Secretario: Dra. Rosa Laura Camarena Mejía (Instituto de Investigaciones Biomédicas).

Agradecimientos

A la tutora principal de este trabajo, la Dra. Imelda López Villaseñor, por aceptarme en su colectivo de trabajo a pesar de llegar retrasada un semestre. Por todo el conocimiento que me transmitió en este tiempo, su preocupación y su forma asequible de ser.

A mi comité tutorial: el Dr. Roberto Coria y la Dra. Gladys Fragoso por dedicarme su tiempo y aportar al trabajo buenas preguntas y sugerencias.

A los miembros del jurado: Dra. María Soledad Funes Argüello, Dra. Ana María Cevallos Gaos, Dr. Julio César Carrero, Dr. Abraham Landa Piedra, Dra. Rosa Laura Camarena Mejía por la revisión y las correcciones realizadas a este escrito.

Al Dr. Roberto Hernández y a la Dra. Ana María Cevallos y sus respectivos grupos de trabajo por colaborar con buenas ideas y recomendaciones en cada seminario realizado.

A la M. en C. Karla López Pacheco por su ayuda técnica imprescindible para este trabajo, por todos sus consejos y por estar siempre dispuesta a ayudarme y enseñarme.

A Oli por toda su ayuda igualmente en el trabajo, por aclararme tantas dudas y tantas noches que me apoyo para salir lo más temprano posible.

A Andrea, Felipe, Israel y Juliana por transmitirme conocimientos igualmente con sus trabajos en los seminarios, por ser tan afables y hacerme sentir siempre en tan buen ambiente.

Al Dr. Raúl Bobes, mi paisano, por toda su ayuda y consejos, tanto desde el punto de vista académico como humano. Por su preocupación siempre por mí y por ser sobre todo tan buena persona.

A Yusniel mi otra familia desde que llegué a este país por su cariño y ayuda en tantos momentos que lo necesité.

A mi esposo Mismel, no hay palabras para agradecer todo su amor y enorme apoyo en esta etapa como en todas las anteriores que hemos vivido juntos.

A mi familia, que ha estado constantemente dándome fuerzas aún desde la distancia y que es mi mayor tesoro.

Abreviaturas

APC/C: Complejo promotor de la Anafase o Ciclosoma (siglas en inglés) que cataliza la ubiquitinación de proteínas promoviendo la transición de metafase a anafase.

ATP: Trifosfato de Adenosina (por sus siglas en inglés).

CRK: cinasa relacionada con Cdc2 (por sus siglas en inglés) de parásitos.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

D.O.: Densidad Óptica.

dNTPs: Trifosfato de desoxirribonucleótidos

HisProbe-HRP: Sonda que detecta la etiqueta de 6X-His.

IPTG: Isopropil- β -D-tio-galactósido.

kDa: kilo Daltons.

LB: Medio de cultivo Luria-Bertani para bacterias.

pb: pares de bases.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PEG: Polietilenglicol.

RNA: Ácido ribonucleico (siglas en inglés).

RFC: Región que flaquea el gen CKS1 de *S. cerevisiae*

SCF: Complejo multiproteico constituido por SKP1, Culina y proteínas que tienen una F-box (siglas en inglés), que cataliza la ubiquitinación de proteínas destinadas a la degradación por componentes del proteosoma.

SDS: Dodecil Sulfato de Sodio.

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.

Tvcks1 y Tvcks2: genes que codifican para las proteínas TvCKS1 y TvCKS2, respectivamente, de *Trichomonas vaginalis*.

TvCKS1 y TvCKS2: Subunidades reguladoras de la cinasa dependiente de ciclina de *T. vaginalis*.

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana.

TA: Temperatura ambiente.

Contenido

1. Introducción.....	5
2. Marco teórico.....	6
2.1. Biología de <i>T. vaginalis</i>	6
2.1.1. Taxonomía.....	6
2.1.2 Ciclo de vida y aspectos fundamentales de la biología celular.....	6
2.1.3 División celular.....	9
2.1.4 Genética.....	9
2.1.5 Factores de virulencia.....	10
2.2. El ciclo celular.....	13
2.3. Principales reguladores del ciclo celular.....	15
2.3.3 Las subunidades reguladoras de las cinasas dependientes de ciclina: CKS.....	25
2.5. Hipótesis:.....	42
2.6. Objetivo general:.....	42
2.6.1. Objetivos específicos:.....	42
3. Metodología.....	44
3.1. Generación de la mutante <i>S. cerevisiae</i> CKS1/cks1 ::KanMX.....	44
3.1.1. PCR para la amplificación del módulo KanMX con secuencias flanqueantes al gen CKS1 de <i>S. cerevisiae</i>	44
3.1.2. Transformación de la levadura diploide <i>S. cerevisiae</i> con el módulo KanMX unido a secuencias flanqueantes al gen CKS1.....	46
3.2. Caracterización de la mutante <i>S. cerevisiae</i> CKS1/cks1 ::KanMX.....	46
3.2.1 Extracción de DNA genómico de levadura.....	46
3.2.2 Primer PCR para la confirmación de la mutante <i>S. cerevisiae</i> CKS1/cks1 ::KanMX.....	47
3.2.3. Segundo PCR para la confirmación de la mutante <i>S. cerevisiae</i> CKS1/cks1 ::KanMX.....	48
3.3. Evaluación de complementación de la mutante diploide <i>S. cerevisiae</i> CKS1/cks1 ::KanMX con las CKs de <i>T. vaginalis</i>	50
3.3.1 Transformación de la cepa mutante diploide <i>S. cerevisiae</i> BY4743 CKS1/cks1.....	50
3.3.2. Inducción de la esporulación de los transformantes URA+.....	52
3.3.3. Ensayo de disección de tétradas.....	52
3.3.4. Ensayo de esporas al azar.....	52
3.3.5 PCR de comprobación de los genotipos identificados a través de la selección por auxotrofías.....	53

3.3.6 Curva de crecimiento de clonas haploides mutantes <i>CKS1⁻</i> de <i>S. cerevisiae</i> con las construcciones pYES2- <i>CKS1</i> , pYES2- <i>Tvcks1</i> y pYES2- <i>Tvcks2</i> .	53
3.4. Evaluación de la formación de homodímeros de <i>TvCKS1</i> y <i>TvCKS2</i>	54
3.4.1 Transformación de <i>Escherichia coli</i> M15 con las construcciones pQE30- <i>Tvcks1</i> y pQE30- <i>Tvcks2</i> .	54
3.4.2. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes <i>TvCKS1</i> y <i>TvCKS2</i> fusionadas a la etiqueta de Histidina.	55
3.4.3. SDS-PAGE y Western blot para reconocer etiquetas de histidinas.	56
4. Resultados.	57
4.1. Construcción de la mutante <i>S. cerevisiae</i> <i>CKS1/cks1 ::KanMX</i> .	57
4.1.1. Amplificación por PCR del módulo <i>KanMX</i> .	57
4.1.2. Reemplazo de uno de los dos alelos de <i>CKS1</i> de <i>S. cerevisiae</i> BY4743.	57
4.2. Confirmación de la mutante <i>S. cerevisiae</i> <i>CKS1/cks1 ::KanMX</i> .	59
4.2.1. Primera estrategia de confirmación.	59
4.2.2. Segunda estrategia de confirmación.	60
4.2.3. Análisis de restricción de los productos de PCR de confirmación.	62
4.3. Ensayo de complementación de la mutante <i>CKS1/cks1 ::KanMX</i> .	65
4.3.1. Transformación de la mutante <i>S. cerevisiae</i> <i>CKS1/cks1 ::KanMX</i> con las construcciones pYES2- <i>Tvcks1</i> y pYES2- <i>Tvcks2</i> .	65
4.3.2. Inducción de la esporulación de las mutantes transformadas.	66
4.3.3. Evaluación de la complementación por disección de tétradas.	66
4.3.4 Evaluación de la complementación por el método de esporas al azar.	70
4.3.5. PCR confirmatorio de la complementación por <i>TvCKS1</i> y <i>TvCKS2</i> .	74
4.3.6. Curva de crecimiento de haploides mutantes con pYES2- <i>Tvcks1</i> , pYES2- <i>Tvcks2</i> y el control positivo pYES2- <i>CKS1</i> .	76
4.4- Dimerización de las <i>TvCKS</i> de <i>T. vaginalis</i> .	79
4.4.1. Expresión y purificación de las proteínas <i>TvCKS1</i> y <i>TvCKS2</i> recombinantes fusionadas a una etiqueta de Histidina.	79
4.5. Formación de dímeros de <i>TvCKS1</i> y <i>TvCKS2</i> recombinantes.	81
5. Discusión de los resultados	82
6. Conclusiones.	88
8. Bibliografía.	90
Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. & Walter P. (2010). Molecular biology of the cell, 5th edition. Biochemistry and Molecular Biology, 36(4), 317–318	90
9. Anexos	98

Resumen.

Trichomonas vaginalis es un protozoo parásito flagelado, agente causal de la tricomoniasis humana, la enfermedad de transmisión sexual no-viral más común en el mundo. Aspectos de la biología básica de este parásito como la regulación de su ciclo celular, que brindan información útil para la búsqueda de nuevas alternativas en su tratamiento y diagnóstico han sido escasamente estudiados. Es por esta razón que, nuestro laboratorio y en específico el presente trabajo, se ha enfocado en investigar sobre esta temática.

El ciclo celular en eucariontes está regulado principalmente por la actividad de los heterodímeros formados por las cinasas dependientes de ciclina (CDK) y las ciclinas. Se ha comprobado que la actividad de este heterodímero “*in vivo*” depende de la unión a una subunidad reguladora de las cinasas dependientes de ciclinas denominadas CKSs.

Las CKSs son proteínas de bajo peso molecular, esenciales y conservadas en todos los organismos eucariontes. Estas se unen al complejo CDK-ciclina actuando como factores de especificidad de sustrato e intervienen en la interacción entre las CDKs y sus reguladores. Además, las CKSs pueden formar dímeros u oligómeros estables y se ha sugerido que esto pudiera ser un mecanismo de regulación de su unión a las CDKs.

En nuestro laboratorio se identificaron previamente dos genes en *T. vaginalis* que codifican para dos proteínas tipo CKS (TvCKS1 y TvCKS2) y se comprobó que interactúan con tres CDKs de *T. vaginalis* (TvCRKs). En el presente trabajo nos propusimos caracterizar funcionalmente a estas proteínas a través de un método de complementación empleando una levadura mutante deficiente en el gen CKS1 y evaluando si estas proteínas podían formar dímeros como sus homólogas de otros organismos. Se obtuvo como resultado que TvCKS1 y TvCKS2 complementan la función de la levadura mutante sustentando su posible papel como reguladores del ciclo celular en *T. vaginalis*. Además, se observó que tanto TvCKS1 como TvCKS2 forman homodímeros lo que, al igual se ha sugerido para otras CKSs, posiblemente sea una forma de regulación de la función de las TvCKSs en *T. vaginalis*. Este trabajo aporta un conocimiento adicional de estas proteínas desde el punto de vista funcional y estimulan a continuar el estudio de su papel como posibles reguladores del ciclo celular en este organismo.

1. Introducción.

La Tricomoniasis es la enfermedad de transmisión sexual no-viral más común en el mundo cuyo agente etiológico es el protista parásito *Trichomonas vaginalis*. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima una incidencia de 276 millones de nuevos casos cada año y una prevalencia de 187 millones de individuos infectados (WHO., 2012). La alta incidencia/prevalencia, el incremento de la resistencia al tratamiento, así como la asociación con otras patologías ha incrementado la atención sobre esta enfermedad (Menezes et al., 2016). Uno de los retos en el diagnóstico y tratamiento final de *T. vaginalis* es la alta proporción de infecciones asintomáticas. Cuando hay síntomas son generalmente leves como: irritación, prurito, descarga vaginal, mal olor y/o inflamación del tracto urogenital y tejidos vecinos. Sin embargo, las infecciones pueden conducir a complicaciones severas como erosión cervical, nacimientos prematuros y/o recién nacidos con bajo peso. Además *T. vaginalis* puede causar esterilidad tanto en el hombre como en la mujer e incrementa el riesgo de adquirir VIH y cáncer cervical. Estas complicaciones sustentan la necesidad de encontrar nuevos blancos terapéuticos y para el diagnóstico de la tricomoniasis mediante un estudio más profundo de la biología básica del agente causal patógeno (Kusian & Gould, 2014).

T. vaginalis es un parásito microaerófilo extracelular, que infecta el tracto urogenital en humanos. En la mujer, coloniza la mucosa del epitelio vaginal y en el hombre el epitelio de la uretra y la próstata donde se reproduce asexualmente por fisión binaria longitudinal. El ciclo celular de este parásito ocurre a través de un proceso denominado mitosis cerrada con un huso extranuclear, donde no existe ruptura de la envoltura nuclear (Ribeiro et al., 2000). Los principales componentes que participan en la regulación del ciclo celular en eucariontes son las proteínas cinasas dependientes de ciclinas (CDKs), las ciclinas y la subunidad reguladora de las cinasas dependientes de ciclina (CKS) (Morgan, 2007). En *T. vaginalis*, estos componentes han sido poco estudiados y son tema de investigación de nuestro grupo de trabajo. El primer reporte de elementos reguladores del ciclo celular en *T. vaginalis* fue realizado por nuestro laboratorio, donde se identificaron 3 proteínas CRKs (TvCRK1, TvCRK2 y TvCRK5) y 2 CKSs putativas (TvCKS1 y TvCKS2) y se demostró que estas últimas se podían unir a dos de las primeras (TvCRK1 y TvCRK2). Sin embargo, su función aún no ha sido definida (Amador et al., 2017).

2. Marco teórico.

2.1. Biología de *T. vaginalis*.

2.1.1. Taxonomía.

T. vaginalis es un protista representativo del subgrupo eucariota Excavata que incluye otros protozoarios parásitos como *Leishmania*, *Trypanosoma* y *Giardia* (Loker & Hofkin, 2015). Dentro del grupo Excavata, *T. vaginalis* se ubica en el orden Parabasalia que agrupa microaerófilos unicelulares flagelados que incluyen parásitos y comensales de hospederos vertebrados, comensales y endosimbiontes de hospederos invertebrados y unas pocas especies descritas de vida libre (Dacks et al., 2008; Amador et al., 2017).

Parabasalia es un linaje altamente divergente de los organismos eucariontes (Hampl et al., 2009; Amador et al., 2017) cuyos miembros presentan propiedades metabólicas y citoesqueléticas inusuales. Una de estas características específicas es la ausencia de mitocondrias y presencia de un organelo relacionado denominado hidrogenosoma (Malik et al., 2011). Otra propiedad, relacionada con el citoesqueleto, es la presencia de un aparato parabasal que consiste en el complejo de Golgi unido a fibras estriadas cerca el cariomastigonte (una estructura que comprende el núcleo y cuatro cuerpos basales que se anclan a los tres flagelos anteriores y al flagelo recurrente) (Arroyo et al., 1993).

2.1.2 Ciclo de vida y aspectos fundamentales de la biología celular.

2.1.2.1 Ciclo de vida y estructura celular

T. vaginalis posee un tamaño promedio de 9 a 23 μm de largo y 7 μm de ancho (Bouchemal et al., 2017). Las células de *T. vaginalis* de vida libre tienen generalmente morfología piriforme. La forma virulenta de este parásito pasa por un proceso de morfogénesis donde las células se vuelven ameboides en pocos minutos cuando se exponen al tejido del huésped (Hirt, 2013).

T. vaginalis tiene 4 flagelos anteriores de 7 a 18 μm de largo que le confieren su movimiento característico torcido y ondulante. Además, presenta un quinto flagelo ubicado en el extremo posterior incorporado en una membrana ondulante cuya longitud es equivalente a la mitad del tamaño de la célula y está sostenido por una estructura delgada, no contráctil denominada costa (Benchimol, 2004). La costa es parte de un conjunto de estructuras

citoesqueléticas únicas en parásitos Parabasalia. Otros componentes de este grupo son el axostilo que consiste en una docena de microtúbulos altamente organizados y la pelta, la cual está conectada con el axostilo y lo envuelve a través del complejo del cuerpo parabasal (Preisner et al., 2016) (Figura 1).

T. vaginalis presenta también un núcleo, característico de células eucariontes, así como un aparato de Golgi altamente desarrollado (Preisner et al, 2016; Bouchemal et al., 2017).

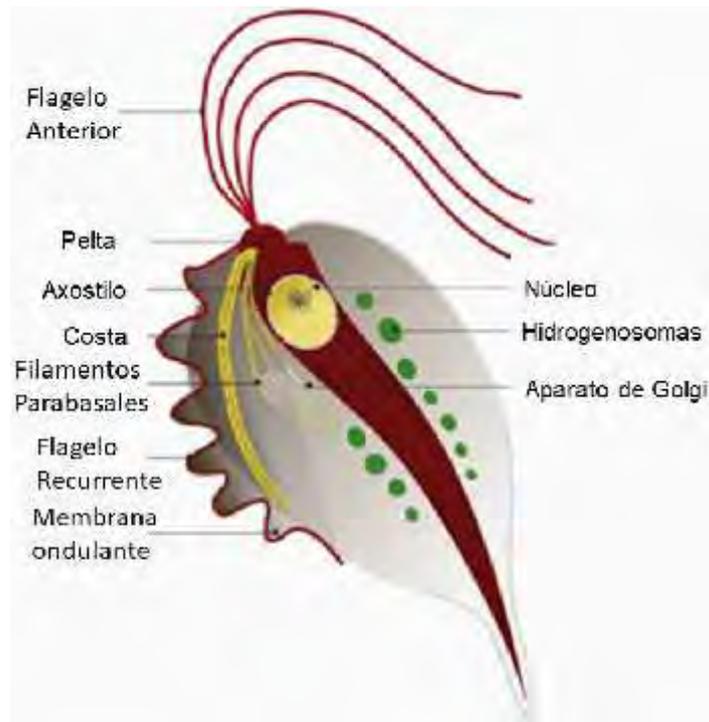


Figura 1. Dibujo esquemático de *T. vaginalis*. Se ilustran las principales estructuras citoesqueléticas y organelos (Tomado de Preisner et al., 2016).

2.1.2.2 Metabolismo

T. vaginalis prolifera principalmente en hábitats anaeróbicos. Este parásito emplea los carbohidratos como la principal fuente de energía a través de la fermentación tanto en condiciones aerobias como anaerobias (Petrin et al., 1998). El metabolismo de los carbohidratos en *T. vaginalis* se lleva a cabo en dos compartimientos: en el citoplasma y en los hidrogenosomas. En el citoplasma de *T. vaginalis* ocurre la vía clásica de glucólisis. Los hidrogenosomas posteriormente importan piruvato y malato para generar ATP a través de la fosforilación a nivel de sustrato, sin el uso de O₂ como último

aceptor de electrones y liberando CO₂, hidrógeno molecular y acetato como productos finales (Petrin et al., 1998). Los hidrogenosomas carecen de ADN, así como de crestas, citocromos y quinonas los cuales son componentes típicos de las mitocondrias (Martin, 2006).

La descarboxilación oxidativa del piruvato para formar Acetil coenzima A está catalizada por la piruvato: ferredoxina oxidorreductasa (PFO, siglas en inglés), una enzima localizada en las membranas de los hidrogenosomas (Meza-Cervantez et al., 2011). Esta enzima contiene motivos Fe-S que transfiere electrones de manera semejante al complejo de transporte de electrones de las mitocondrias. La formación de hidrógeno está catalizada por la Hidrogenasa Fe-Fe, una oxidorreductasa presente en los hidrogenosomas que utiliza para este fin los electrones derivados del piruvato y transferidos por la Ferredoxina 2Fe-2S (Hrdý et al., 2008). Varios estudios han demostrado que concentraciones de O₂ ambientales [21% (vol / vol) en aire], provocan la inhibición o inactivación de estas dos enzimas afectándose el metabolismo energético del parásito. (Lloyd, 1996; Müller et al., 2012).

Muchos protistas como *T. vaginalis* pueden multiplicarse fácilmente en presencia de bajas concentraciones de O₂, en el intervalo de 3 a 30 μM correspondiente a 1 al 10% de los niveles presentes en la atmósfera (Müller et al., 2012). Algunos, como *T. vaginalis*, se ha visto que pueden crecer incluso ligeramente más rápido en presencia de bajas concentraciones de O₂ que en completa ausencia de O₂ (Paget Lloyd, 1990).

Niveles de O₂ en el rango de 1 μM provocan cambios metabólicos que dan lugar a la liberación de productos finales del metabolismo energético con alto grado de oxidación lo cual resulta en niveles incrementados de ATP a través de la misma reacción de fosforilación a nivel de sustrato que funciona en ausencia de O₂ (Müller et al., 2012). Además, se ha identificado en las trichomonas la presencia de una enzima NADH oxidasa, también llamada diaforasa, que transfiere 4 electrones de la oxidación de la glucosa directamente al O₂, produciendo agua (Tanabe 1979; Müller et al., 2012).

Estas circunstancias son las bases para designar estos protistas como microaerófilos en lugar de la designación más genérica de anaeróbicos (Müller et al., 2012).

2.1.3 División celular

La fisión binaria longitudinal es, hasta ahora, la forma principal descrita de división en *T. vaginalis*, pero en el parásito y especies relacionadas se ha observado también la formación de estructuras multinucleadas que pueden migrar activamente a la célula del hospedero y de las cuales pueden brotar las células individuales (Paget & Lloyd, 1990).

Los organismos pertenecientes al phylum Parabasalia se caracterizan por presentar una mitosis cerrada en la que la envoltura nuclear permanece intacta durante todo el proceso de división y el huso mitótico permanece extranuclear (Gerbord et al., 2000).

La mitosis en *T. vaginalis* dura alrededor de 45 minutos y está dividida en 5 fases: Profase, Metafase temprana y tardía, Anafase temprana y tardía y citocinesis. (Gómez-Conde et al., 2000).

Un estudio realizado por Riley y colaboradores (Riley et al., 1994) mostró que las células de *T. vaginalis* exhiben un perfil inusual de ciclo celular en el que el período G2 es dominante en el crecimiento logarítmico y la sincronía de la fase G2 se induce en la fase estacionaria. Además, se observó que compuestos que detuvieron las células de levaduras y vertebrados en la fase G1/S no tuvieron efectos en el ciclo celular *T. vaginalis*. Por otra parte, los inhibidores mitóticos antimicrotúbulos, Colchicina y Nocodazol, indujeron sincronización de la fase G2 en *T. vaginalis*. Estas observaciones sugirieron que el ciclo celular en *T. vaginalis* es similar al de las células de levaduras y vertebrados en las fases G2 y M, pero la transición entre las fases G1/S es diferente en el parásito.

2.1.4 Genética.

El genoma y la capacidad codificadora asociada a *T. vaginalis*, al contrario de lo que sucede en muchos otros parásitos, no está experimentando reducción. La secuenciación original del genoma estimó que el genoma del parásito codifica para más de 60 000 proteínas en 6 cromosomas haploides que juntos comprenden aproximadamente 160 Mpb (Carlton et al., 2007).

En un estudio posterior, después de agrupar secuencias idénticas, se estimaron 46000 genes en *T. vaginalis* incrementando el genoma estimado a 175 Mpb (Smith and Johnson, 2011).

Estas diferentes estimaciones de la talla del genoma y el número de genes codificantes se deben en gran medida a la naturaleza repetitiva del genoma (se cree que más del 65% del genoma consiste en secuencias repetidas) y a un número desconocido de eventos de duplicación del genoma que ha causado que muchas familias de genes se expandan masivamente (Kusdian et al., 2014).

2.1.5 Factores de virulencia

El trofozoito es típicamente considerado como la forma infecciosa de *T. vaginalis* (Hirt, 2013). A diferencia de la *Giardia*, otro parásito anaerobio del grupo Excavata, ni el ciclo de vida de las *Trichomonas* ni su modo de transmisión requiere de un estado quístico (Harp & Chowdhury, 2011; Petrin et al., 1998). Adicionalmente el parásito puede diferenciarse en pseudoquistes bajo condiciones no favorables como exposición al frío u otros factores de estrés (Pereira-Neves et al., 2003). En estos pseudoquistes la membrana plasmática se vuelve perfectamente esférica sin flagelos visibles y los pseudoquistes pueden dividirse y diferenciarse en trofozoitos nuevamente. (Pereira-Neves et al., 2003; Hirt, 2013). También se ha observado que estos *T. vaginalis* puede formar largos agregados, un proceso conocido como “enjambre” el cual se ha sugerido que ocurre como reacción de defensa o estrés (Hirt, 2013). Esta forma se ha observado también en cultivos que alcanzan la fase estacionaria (Harp & Chowdhury, 2011).

T. vaginalis infecta el epitelio escamoso del tracto genital. En la mujer el principal sitio de infección con *T. vaginalis* es la vagina, pero los trofozoitos pueden alcanzar también la uretra y el endocervix. Por otra parte, en el hombre, el parásito reside en la próstata y la uretra (Menezes et al., 2016). La mayoría de las mujeres (85 %) y hombres (77 %) infectados con *T. vaginalis* son asintomáticos. Un tercio de las mujeres asintomáticas se vuelven sintomáticas en 6 meses (Kinssinger 2015).

T. vaginalis es transmitido entre humanos, principalmente por relaciones sexuales. La adhesión de *T. vaginalis* a la célula huésped es el primer paso crítico en la patogénesis de la tricomoniasis. El cambio a la forma amebode inicia señales tempranas de unión y contribuye a incrementar la expresión de moléculas de adhesión (Kissinger, 2015).

T. vaginalis puede ocasionar hemólisis a través de la secreción de proteínas semejantes a perforinas que forman poros en la pared celular de los glóbulos rojos. Además, el parásito puede provocar este mismo efecto a través de la fagocitosis de los glóbulos rojos. *T. vaginalis* no es capaz de sintetizar hierro y ácidos grasos para su sobrevivencia individual, teniendo en cuenta este hecho se ha sugerido que los glóbulos rojos son una de las fuentes principales de estos nutrientes (Malla et al., 2014).

La secreción de enzimas con actividades cistein-proteasas (CPs) tienen un importante papel en la patogénesis del parásito. *T. vaginalis* tiene de 11 a 23 cistein-proteasas diferentes que intervienen en la nutrición, hemólisis y también ayudan a la invasión del parásito (Malla et al., 2014).

Estudios recientes demostraron la secreción por el parásito de vesículas tipo exosomas, y no tanto de proteínas y factores solubles. Estos exosomas contienen RNA y una variedad de proteínas, y se demostró que pueden unirse a la célula huésped y modular la virulencia del parásito contra las células vaginales y de la próstata. También se demostró que estas vesículas tienen propiedades inmunomoduladoras, acentuando el efecto de las moléculas secretadas en el establecimiento de la infección (Twu et al., 2013, Fichorova et al., 2017).

Se ha descrito que las CPs en *T. vaginalis* disminuyen los niveles de IgG e IgA vaginales, por lo que la habilidad del parásito de evadir el sistema inmune del huésped es uno de los aspectos importantes de la patogénesis. Adicionalmente, el mucus cervical es deficiente en el complemento lo que permite al parásito evadir la destrucción mediada por esta vía de defensa (Malla et al., 2014, Twu et al., 2013, Fichorova et al., 2017). Se ha propuesto que *T. vaginalis* puede hacer el papel de “caballo de Troya” en el ambiente microbiano, ya que puede tener una asociación simbiótica con *Mycoplasma hominis*, una pequeña bacteria asociada con infecciones de los sistemas respiratorio y urogenital. Varios estudios demostraron que la asociación entre ambos microorganismos alcanza valores de prevalencia elevados de entre 20 y 92% y que esto puede influenciar positivamente los efectos citopatogénicos de *T. vaginalis* sobre las células epiteliales y las respuestas inflamatorias (Malla et al., 2014, Fichorova et al., 2017).

T. vaginalis puede también ser infectada por cuatro virus conocidos como virus de *T. vaginalis* (Tv) que son miembros de la familia Totiviridae. Se ha demostrado una asociación entre la presencia de los virus y la expresión de proteínas inmunogénicas en la superficie de *T. vaginalis*, variaciones fenotípicas en el protozooario, y sobreexpresión de ciertos factores de virulencia (Fichorova et al., 2017).

Un aspecto muy importante de la infección con *T. vaginalis* es su asociación con la transmisión y adquisición de VIH. Existen estudios que han mostrado que la tricomoniasis está asociada con un incremento de 2.7 veces en el riesgo de adquisición de VIH. Estos datos son especialmente significativos teniendo en cuenta la alta prevalencia de la tricomoniasis en la población en general, y en grupos de riesgo en particular (Menezes et al., 2016).

Varias investigaciones indican que existe un mayor riesgo de adquisición de VIH entre mujeres infectadas por *T. vaginalis* en comparación con mujeres no infectadas. Esta mayor susceptibilidad puede deberse desde el punto de vista biológico a tres razones: la respuesta inflamatoria a la infección por TV provoca una mayor aparición de células diana del VIH ; La infección por TV puede dañar la barrera mecánica al VIH a través de hemorragias puntiformes de la mucosa y la infección por TV puede cambiar la flora vaginal normal lo cual la hace más permisiva para la vaginosis bacteriana y esto a su vez puede aumentar el riesgo de contraer el VIH (Kissinger, 2015).

Otro aspecto que destacar con respecto a las complicaciones de la tricomoniasis en la mujer es su relación con un incremento del riesgo de desarrollar cáncer cervical (Kissinger, 2015; Fichorova et al., 2017). Existen evidencias de que la infección con *T. vaginalis* está asociada a la adquisición del Virus del Papiloma Humano (Gram et al., 1992; Ghosh et al., 2017). Este virus ha sido relacionado con diferentes tipos de cáncer incluyendo cáncer cervical por lo que pudiera existir una relación indirecta entre la infección con *T. vaginalis* y la aparición de neoplasia cervical (Kissinger, 2015; Ghosh et al., 2017).

T. vaginalis puede estar también relacionada con cáncer en el hombre. Aunque se han encontrado resultados contradictorios relacionados con el estado serológico de *T. vaginalis* y el cáncer de próstata, evidencias recientes sugieren una fuerte asociación (Kissinger, 2015; Fichorova et al.,

2017). Este parásito ha sido frecuentemente encontrado en muestras de fluido prostático de hombres asintomáticos parejas de mujeres con tricomoniasis por lo que se cree que la próstata puede servir como reservorio de *T. vaginalis* en el hombre. La tricomoniasis puede causar prostatitis crónica, y se ha detectado adicionalmente la presencia de este parásito en tejido prostático hiperplásico benigno. Se han propuesto dos mecanismos moleculares sinérgicos para explicar cómo este parásito puede contribuir al cáncer de próstata. Primero, la infección con *T. vaginalis* está caracterizada por citopatogenicidad, influxo de leucocitos e inflamación crónica que es importante para el desarrollo de cáncer. Segundo, se ha sugerido que la unión de proteínas adhesinas específicas de *T. vaginalis* a células epiteliales normales de la próstata desencadena una cascada de señalización a través de proto-oncogenes conocidos P1M1, c-MYC HMGA1 que finalmente conducen a la carcinogénesis de próstata (Sutcliffe et al., 2012).

2.2. El ciclo celular

El ciclo celular constituye una secuencia ordenada de eventos en los que la célula duplica su contenido y se divide en dos células hijas (Alberts et al., 2010).

El ciclo celular eucariota ha sido normalmente dividido para su estudio en 4 fases: Gap1 (G1), Síntesis (S), Gap2 (G2) y Mitosis en células somáticas o Meiosis en células germinales (M). En la mayoría de los ciclos celulares las fases G1 y G2 separan la fase S y la fase M. Estos son períodos en los que la célula crece y que proveen de tiempo para monitorear el ambiente externo e interno para asegurar que las condiciones son favorables antes de que la célula desencadene los eventos de fase S y M. En la mayoría de las células la fase G1 es el período de tiempo que transcurre entre la fase M y la fase S mientras que la fase G2 separa el final de la síntesis de DNA en la fase S de la iniciación de la mitosis. A las fases G1, S y G2 se les denomina en conjunto: interfase (Alberts, 2010).

Las células pueden entrar también en un estado de quiescencia o reposo denominado G₀ en el cual ha cesado el crecimiento y no replican su DNA, aunque son metabólicamente activas. En este estado pueden permanecer días, semanas o incluso años antes de volver a proliferar. Muchas células se

mantienen permanentemente en G_0 hasta que ellas o el organismo mueren (Alberts et al., 2010).

El comienzo de la fase S está marcado por el inicio de la replicación del DNA. El comienzo de la mitosis es acompañado por la ruptura de la envoltura nuclear y la condensación de los cromosomas. La mitosis se divide en 4 etapas: Profase, Metafase, Anafase y Telofase. La segregación de las cromátidas hermanas marca la transición de la metafase a la Anafase (Hochegger et al., 2008; Harashima et al., 2013).

La Citocinesis es el proceso que sigue a la mitosis y completa el programa de división celular con la formación de dos células hijas separadas por la membrana plasmática y, dependiendo de la especie, la pared celular (Harashima et al., 2013).

La progresión a través del ciclo celular es regulada a través de distintos puntos de control. Estos puntos claves en la regulación son la entrada a la fase S (punto de control $G1-S$), la entrada a la mitosis (punto de control $G2-M$) y la transición de la Metafase a la Anafase (Harashima et al., 2013) (Figura 2).

Los puntos de control en el ciclo celular eucariótico aseguran que la división se produzca solo después de un crecimiento suficiente y una replicación fiel del ADN, y solo cuando existan condiciones internas y externas favorables. En cada punto de control, numerosas proteínas participan en una serie de reacciones bioquímicas cuidadosamente coordinadas. Esta complejidad permite una regulación precisa de todos los pasos en el ciclo celular, y es esencial para evitar consecuencias devastadoras en la división celular que puedan perpetuarse (Harashima et al., 2013).

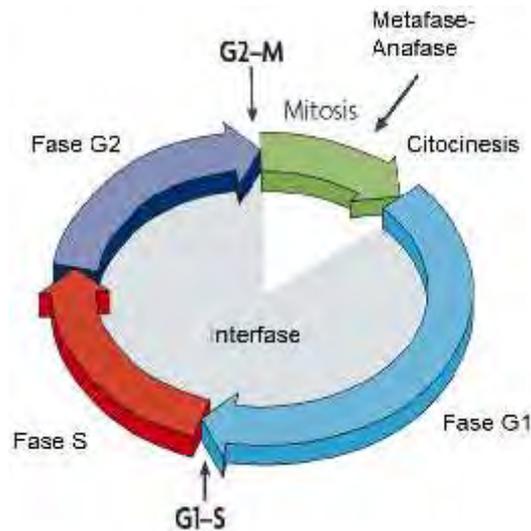


Figura 2. Modelo clásico de las fases y puntos de control del ciclo celular (señalados con saetas). (Modificado de Hocheggeri et al., 2008).

2.3. Principales reguladores del ciclo celular

La división celular es una de las características fundamentales de la vida y, por lo tanto, varios elementos del control de este proceso son comunes tanto para procariontes como para eucariontes (Amon, 1998). El grado de conservación evolutiva es especialmente notable entre los eucariontes, donde la progresión a través de las fases sucesivas del ciclo celular en especies tan diversas como la levadura y humanos es impulsada por una clase común de proteínas cinasas denominadas cinasas dependiente de ciclinas (CDK), por las proteínas ciclinas y por la subunidad reguladora de la CDK (CKS). La expresión y función de estas proteínas está bajo un control estricto para garantizar una división celular exitosa (Mironov et al., 1999).

Un estudio comparativo de la regulación del ciclo celular entre diferentes organismos eucariontes apoyó la idea de que los eucariontes tempranos ya tenían un ciclo celular complejo, con parte de la red reguladora clave en el antepasado común de todos los eucariontes. Sin embargo, este mismo estudio demostró que el ciclo celular también muestra una sorprendente capacidad de variación. No solo se ha observado que puede desempeñar roles similares mediante la sustitución por proteínas nuevas en nodos conservados de la red reguladora, sino que incluso las vías aparentemente cruciales pueden alterarse drásticamente (Harashima et al., 2013). Mientras que las algas y hongos unicelulares tienen repertorios de CDK-ciclina relativamente pequeños, en

metazoarios y plantas en floración, tanto las familias de genes de CDK como de ciclina han experimentado de manera independiente especializaciones funcionales específicas del linaje (Harashima et al., 2013).

2.3.1. Cinasas dependientes de ciclina (CDK)

Las transiciones coordinadas entre las fases del ciclo celular dependen esencialmente de una familia de proteínas conservadas evolutivamente denominadas Cinasas Dependientes de Ciclinas (CDKs) (Canavese et al., 2012).

Las CDKs son cinasas de serina/treonina que requieren para su actividad de la unión a una subunidad reguladora llamada ciclina. Las CDKs se caracterizan por su dependencia de subunidades separadas de proteínas que proveen secuencias adicionales requeridas para su actividad enzimática (Malumbres, 2014).

Todas las CDKs tienen una estructura bilobulada. El lóbulo N-terminal está formado fundamentalmente por hojas β -plegadas y el lóbulo C-terminal está compuesto por α -hélices. El lóbulo N-terminal contiene el componente inhibitorio conocido como lazo-G (rico en glicina) y el lóbulo C-terminal contiene segmentos de activación (conocido como lazo T) que incluyen residuos fosforilables de serina o treonina. El sitio activo está ubicado entre los dos lóbulos (Malumbres, 2014; Kalra et. al., 2017).

Muchas CDKs comparten un motivo en una α -hélice característica situada en el lóbulo N-terminal. Este motivo está constituido por una secuencia de 16 aminoácidos EGVSTAIRESLLKE, abreviada como PSTAIRE, la cual es una región involucrada en la unión a ciclinas. El motivo PSTAIRE está presente en Cdc2 de *S. pombe* y Cdc28 de *S. cerevisiae* y ha servido para identificar homólogos de Cdc2 en muchos organismos. Otras CDKs con funciones más especializadas y limitadas en el ciclo celular tienen un motivo parcial PSTAIRE o una variación en la secuencia que parece mantener la función de unión a ciclinas (Srivastava, 2002; Malumbres, 2014).

Las CDKs interactúan con sus sustratos con cierta especificidad por la secuencia consenso S/TPXK/R (donde X representa cualquier aminoácido) que contiene el sitio de fosforilación (Figura 3). Esta interacción se produce como consecuencia de la presencia de un bolsillo hidrofóbico cerca del sitio catalítico

de la CDK que acomoda la prolina con posición +1. Sin embargo, el requisito para el residuo básico en la posición +3 no se mantiene en Cdk4 o CDK transcripcionales, que se unen a secuencias consenso S/T-P-X menos estricta (Malumbres, 2014).

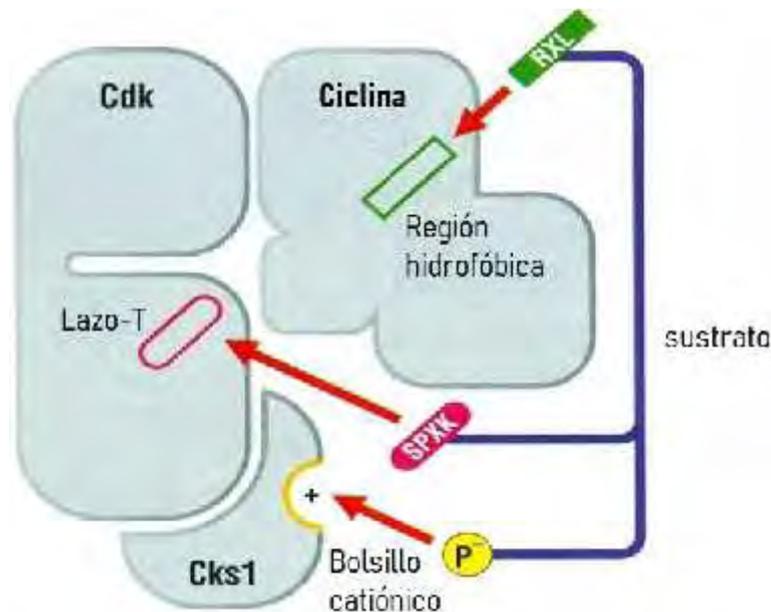


Figura 3. Sitios de reconocimiento del sustrato complejo CDK-Ciclina-CKS. El sitio central de reconocimiento del sustrato cae en el sitio activo lazo-T el cual interactúa con la secuencia consenso SPXK que contiene el sitio de fosforilación. Un motivo RXL en algunos sustratos interactúa con una región hidrofóbica en la ciclina y de esta manera incrementa la velocidad de fosforilación. La presencia de un bolsillo catiónico de unión a fosfato en la subunidad reguladora accesoria CKS1 puede facilitar interacciones con blancos que contienen sitios múltiples de fosforilación (Modificado de Morgan, 2007).

En *Saccharomyces cerevisiae* se han descrito 6 CDKs. Estas CDKs pueden ser ubicadas en dos grupos: el primero, constituido por CDKs que unen múltiples ciclinas y pueden regular el ciclo celular y el segundo, compuesto por CDKs que son activadas por una sola ciclina, no son reguladas usualmente de una manera dependiente del ciclo celular y están involucradas en la regulación de la transcripción. En *S. cerevisiae*, dos CDKs (Cdc28 y Pho85) componen el primer grupo, cada una de estas une 9 o 10 ciclinas, respectivamente. El segundo grupo comprende cuatro CDKs (Kin28, Srb10, Bur1 y Ctk1) cada una activada por una única ciclina específica. Las ciclinas que se unen a este último

grupo de CDKs usualmente no son reguladas de una manera dependiente del ciclo celular (Malumbres, 2014).

En *S. cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*, solo una CDK (Cdc28 y Cdc2, respectivamente), es esencial para la proliferación de estas levaduras. Estas cinasas pueden controlar completamente el ciclo celular uniéndose a ciclinas específicas en diferentes estados del ciclo. En *S. cerevisiae* Pho85, aunque no es esencial, es una CDK altamente relevante requerida para la viabilidad en condiciones de stress por ejemplo el crecimiento después de la inanición. El resto de las CDKs en *S. cerevisiae* contribuyen a la progresión del ciclo a través de regular la expresión genética y el metabolismo celular (Malumbres et al., 2014).

En contraste, en metazoarios las CDKs han evolucionado formando pequeñas familias donde los miembros individuales desarrollan funciones diferentes durante el ciclo celular; por ejemplo, la Cdk1 controla fundamentalmente la mitosis y la Cdk2 se encarga de regular la entrada a la fase S en humanos, ratón, *Xenopus laevis*, *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* con la ayuda adicional de Cdk4 y Cdk6 (Harashima et al., 2013; Malumbres et al., 2009)

El genoma de los mamíferos contiene al menos 20 CDKs y existe una amplia red de interacción entre CDKs y ciclinas. CDK1 es el único miembro esencial de la subfamilia de las CDKs (Brown et al., 2015). Varios estudios han demostrado que los ratones knockouts de Cdk2, Cdk4 y Cdk6 son viables (Brown et al., 2015). Las células manejadas por ingeniería genética para expresar solo CDK1 pueden exitosamente replicar y dividir su DNA, ya que bajo estas circunstancias CDK1 puede formar complejos con las ciclinas A, B, D y E (Brown et al., 2015).

Durante el ciclo celular, en la mayoría de los casos, la concentración de la subunidad cinasa es relativamente constante mientras que la concentración de la subunidad ciclina oscila de manera importante durante el ciclo (Hochegger et al., 2008) (ver sección 2.4.2). La cinasa es completamente inactiva sin la unión a la ciclina pareja. Igualmente, la activación de la holoenzima, además de la unión a la ciclina, requiere de la fosforilación de residuos importantes en el lazo T de la CDK [por ejemplo, treonina 161 (T-161) en CDK1 y treonina 160 (T-160) en CDK2] (Figura 3); este residuo es fosforilado por la cinasa activadora de

CDK (CAK). La fosforilación en este sitio mejora la unión al sustrato y la estabilidad del complejo CDK-ciclina (Pavletich, 1999).

Así pues, el mecanismo de activación de la CDK involucra su unión a una ciclina en el segmento C-terminal vía interacciones no covalentes lo que conlleva a la accesibilidad del ATP al sitio catalítico para la fosforilación del residuo de treonina activador (Kalra, 2017).

Los miembros de la familia de CDKs y ciclinas son en su mayoría intercambiables lo que permite formar un gran número de combinaciones en la célula y de esta manera ampliar la complejidad en la modulación de la actividad de las CDKs. Esta promiscuidad y su habilidad para fosforilar múltiples sustratos constituyen las bases de la regulación dinámica de las cinasas y, por tanto, la regulación del ciclo celular en respuesta a diferentes señales celulares (Malumbres, 2014).

En humanos la CDK1 fue identificada como homóloga de *S. cerevisiae* /*S. pombe* Cdc28/Cdc2. Esta enzima se une a la ciclina A y a la ciclina B durante el ciclo celular de este organismo. La ciclina A se expresa primero durante la fase G1 tardía, donde inicialmente se une a CDK2 promoviendo la entrada a la fase-S. Posteriormente los niveles de ciclina A incrementan y esta se une y activa rápidamente a CDK1 para generar complejos detectables de CDK1-ciclina A. Hacia la transición S/G2, CDK1-ciclina A también regula la entrada a la mitosis y este complejo persiste hasta la destrucción de la ciclina A vía el complejo del ubiquitina-proteosoma al inicio de la pro-metáfase temprana (Brown, 2015). La CDK1 de humanos es la única CDK que se une a la ciclina B, la cual comienza a acumularse en la fase S. A diferencia del complejo CDK1-ciclina A cuya actividad depende de la acumulación de la ciclina, la actividad de CDK1-ciclina B es regulada por las actividades opuestas de las proteínas cinasa Wee1 y la proteína fosfatasa Cdc25, que en conjunto determinan el grado de inhibición por la fosforilación dentro del sitio activo CDK1 (Brown, 2015).

La activación de CDK1-ciclina B indica el inicio de la mitosis y los complejos CDK1 de las ciclinas A y B son necesarios para garantizar su finalización con éxito. La actividad de CDK1 es disminuida en el comienzo de la Anafase como resultado de la ubiquitinación y posterior degradación de las ciclinas A/B a través de las actividades respectivas de la ubiquitina ligasa APC/C y el proteosoma (Brown, 2015).

Se han identificado un amplio espectro de sustratos sobre los que actúan las CDKs de vertebrados. La mayoría de estos sustratos participan en procesos celulares críticos que incluyen ensamblaje nuclear, regulación de la actividad de la CDK, organización del citoesqueleto, tráfico vesicular y migración celular (Errico, 2010).

Las CDKs activas pueden ser “apagadas” de diferentes maneras. Por ejemplo, las subunidades de ciclina pueden ser degradadas por proteólisis mediada por ubiquitinas altamente específicas. Además, la holoenzima puede asociarse con proteínas inhibitoras de unión fuerte como Sic1 (en *S. cerevisiae*) y miembros de la familia p21 (Cip1) (en vertebrados) (Hochegger, 2008; Fisher et al., 2012). Igualmente, las CDKs pueden estar sujetas a fosforilaciones inhibitoras en residuos específicos como por ejemplo la treonina 14 (T-14) y y tirosina 15 (Y-15) en CDK1. La fosforilación en estos residuos la llevan a cabo las cinasas Wee1 y Myt1, su efecto inhibitor radica en que interfieren con el adecuado alineamiento del ATP en el sitio activo de la CDK (Pavletich, 1999).

En protozoarios se han identificado algunas proteínas reguladoras del ciclo celular. Algunos genes que codifican para miembros de la familia de proteínas cinasas CDKs han sido identificados en tripanosomátidos. Estos y sus productos han sido genéricamente denominados como: cinasas relacionadas con Cdc2 (CRKs siglas en inglés) para reflejar que en la mayoría de los casos se ha demostrado la relación estructural, pero se ha dificultado la relación funcional con las CDKs de otros organismos (Doering et al., 2000).

El análisis del genoma de los tres protozoarios parásitos tripanosomátidos, *Leishmania major*, *T. brucei* y *T. cruzi*, revela que la familia de las CRKs en éstos es relativamente grande, en comparación con otros organismos unicelulares, siendo identificadas 11 CRKs en *T. brucei* y *L. major* y 10 en *T. cruzi* (Walker et al., 2011). En cuanto a complejidad parecen ser más similares a organismos multicelulares que a la levadura. Esto se ha sugerido que tiene que ver con la existencia de un vínculo integral entre el control del ciclo celular y la diferenciación del ciclo de vida de estos parásitos que pudiera requerir de especialización en las CRKs (Grant, 1998).

La proteína denominada CRK3 ha sido de las más estudiadas en *Leishmania mexicana* (Grant et al., 1998), *Leishmania major* (Wang et al., 2009), *Trypanosoma brucei* (Tu & Wang, 2004) y *Trypanosoma cruzi* (Santori et al.,

2002). Un conjunto importante de datos respalda la idea de que CRK3 es un homólogo funcional de CDK1 en estos parásitos (Walker et al., 2011). La CRK3 de *L. major* puede complementar una mutante nula de *S. pombe* Cdc2 sensible a la temperatura, demostrando así su homología funcional con Cdc2 / CDK1 (Wang et al., 2009). El gen de *L. mexicana* CRK3 (con 99% de identidad con CRK3 de *L. major*) es esencial, como corresponde a un regulador crucial de la división celular (Hassan et al., 2001). En *T. cruzi*, CRK3 también se expresa en todas las formas de ciclo de vida. En *L. mexicana* y *T. brucei*, se mostró que CRK3 se unía tanto a p13 como al homólogo de la CKS de Leishmania p12, mostrando actividad de la histona H1 quinasa (un sustrato clásico de CDK) (Hammarton, 2007).

Adicionalmente el análisis de secuencia de la CRK3 de estos parásitos indicó que contiene residuos y dominios conservados en otros organismos importantes para la actividad de las CDKs identificadas en otros organismos como son: el dominio PSTAIRE, implicado en la unión de ciclina; T-14 y Y-15, que se requieren para la unión de ATP y T-161, el residuo del lazo T activador fosforilado por CAK (Walker et al., 2011).

En *T. brucei*, aunque las CRKs identificadas se agrupan filogenéticamente con las CDKs de otros organismos, más de la mitad contienen inserciones en su dominio catalítico de cinasa en comparación con la CDK1 de humano, y la mayoría tienen extensiones en el extremo amino y/o carboxilo. Además, los motivos de la caja PSTAIRE aunque reconocibles, son divergentes (Hammarton, 2007).

En tripanosomátidos, se han identificado adicionalmente 10 ciclinas putativas, CYC2-11. Leishmania posee una ciclina adicional, CYCA, que está ausente tanto de *T. brucei* como de *T. cruzi* (Walker et al., 2011).

En *T. brucei* se sabe poco sobre las parejas de las ciclinas y CRK, solo se ha demostrado que CRK3 es dependiente de ciclina e interactúa tanto con CYC2 como con CYC6 (Walker et al., 2011).

En tripanosomátidos se han identificado homólogos de otros reguladores importantes de la actividad de la CRK, como la proteína Wee1. También se identificó la presencia de una proteína accesoria reguladora de la CDK homóloga a CKS1 en estos organismos y se demostró que las CRKs de tripanosomátidos pueden asociarse a dichas proteínas. Sin embargo, no se han

identificado proteínas homólogas a otros reguladores importantes de CDK como Myt1, Cdc25 y CAK, ni de proteínas inhibitoras. La falta de identificación de estos reguladores se explica potencialmente por la divergencia observada en la secuencia primaria de aminoácidos de las CRKs de estos parásitos. Esto puede sugerir que otros mecanismos han evolucionado para regular la actividad de las CRKs en tripanosomátidos (Hammarton, 2007).

En *T. vaginalis* fueron identificados tres proteínas CRKs (TvCRK1, TvCRK2, TvCRK5). El análisis aminoacídico de TvCRK1 y TvCRK2 y el alineamiento de secuencias con CDKs de diversos organismos sugirió que parecen estar estrechamente relacionadas con la subfamilia de CDK1 al igual que ocurre con Cdc28 de *S. cerevisiae*, Cdc2 de *S. pombe* y CRK3 de *T. brucei*. Además, los miembros de esta subfamilia tienen en su estructura un motivo característico de unión a CKSs que está presente igualmente en TvCRK1 y TvCRK2. Por otra parte CRK5 comparte características estructurales semejantes a la proteína Pho85 de *S. cerevisiae* y CDK5 de *H. sapiens* considerándose un miembro putativo de la subfamilia CDK5 (Amador, 2017). Los miembros de esta subfamilia no tienen motivo de unión a CKSs y el residuo activador fosforilable de treonina no es requerido (Malumbres 2014). Desde el punto de vista funcional en este estudio se demostró que la ciclina tipo B putativa de *T. vaginalis* (TvCYC1) se une y activa la función cinasa tanto de TvCRK1 y TvCRK5. Por otra parte, fue demostrado que ninguna de las tres TvCRKs pueden complementar la ausencia de Cdc28 en *S. cerevisiae*. Esto se sugirió que puede ser debido a que las TvCRKs no sean capaces de reconocer sustratos de la Cdc28 de *S. cerevisiae* o que no pueden interactuar con las proteínas reguladoras de levadura, por ejemplo: ciclinas, fosfatasas, activadores e inhibidores de cinasa etc (Amador, 2017).

2.3.2. Ciclinas.

Las ciclinas son subunidades activadoras esenciales de las CDKs y comprenden una amplia familia de proteínas conservadas en función, desde levaduras a humanos (Andrews & Measday, 1998).

Como indica el nombre, las ciclinas son proteínas cuya concentración varía a través del ciclo celular. Dado que la unión de las ciclinas es uno de los principales estímulos activadores de las CDKs, la concentración celular de la

mayoría de las ciclinas en levaduras y mamíferos está estrictamente controlada no solo por la regulación de la expresión de ciclina sino también por la abrupta degradación en ciertos puntos durante el ciclo celular (Van Hellemond and Mottram, 2000).

Controlando los niveles de ciclina es posible regular a la CDK en actividad enzimática, en especificidad del sustrato, así como en la localización subcelular de las CDKs. Por otra parte, la ciclina juega un papel fundamental en mantener el orden de los eventos del ciclo celular (Hochegger et al., 2008).

Las ciclinas están estructuralmente definidas por la presencia de la llamada caja de ciclina, un dominio de aproximadamente 100 residuos aminoacídicos que forman un grupo de 5 α -hélices. Muchas ciclinas tienen dos cajas de ciclina, una caja N-terminal para su interacción con las CDKs y otra C-terminal que se requiere para el plegamiento apropiado de la molécula de ciclina (Malumbres, 2014). Las ciclinas mitóticas, contienen un motivo característico de 9 aminoácidos denominado caja de destrucción que dirige la ciclina para la ubiquitinación y posterior degradación por el proteosoma al final de la mitosis (Van Hellemond & Mottram, 2000).

Sustentando su función de conferir especificidad hacia determinadas dianas, algunas ciclinas presentan una región en su superficie conocida como "región hidrofóbica" que se ha reportado que interactúa con una secuencia llamada motivo Cy o RXL en algunos sustratos e inhibidores de las CDKs (Figura 3) (Loog & Morgan, 2005). En general, las ciclinas muestran menor similitud de secuencia aminoacídica entre ellas que las CDKs (Malumbres, 2014).

En *S. cerevisiae*, nueve ciclinas forman complejos con Cdc28p: tres ciclinas G1 (Cln1p a Cln3p) y seis ciclinas de tipo B (Clb1p a Clb6p). En la fase G1, Cln1-3p regulan eventos del ciclo celular como son el inicio "START" (equivalente al punto de restricción en células de mamíferos), la represión de la transcripción inducida por feromonas y la meiosis en células diploides (Mendenhall & Hodge, 1998). Las ciclinas de tipo B se expresan en tres picos sucesivos desde el inicio hasta la mitosis y regulan la mayoría de los eventos durante el ciclo celular. Las ciclinas Clb5p y Clb6p denominadas ciclinas de fase S, se expresan en la fase tardía de G1 y son necesarias para el inicio oportuno de la replicación del ADN. Las ciclinas Clb3p y Clb4p se expresan durante la fase S mientras que Clb1p y Clb2p tienen un pico de concentración en la fase G2.

Debido a las diferencias en los controles transcripcionales, las ciclinas de tipo B aparecen en momentos diferentes, pero sus patrones de expresión se superponen. Por este motivo ha sido difícil asignar funciones específicas a las ciclinas de tipo B de manera individual (Andrews & Measday, 1998).

En eucariontes más complejos se han identificado más de 11 ciclinas. Los estudios sobre las cuatro clases principales de ciclinas de mamíferos, las ciclinas de tipo A, B, D y E durante la mitosis, han establecido un modelo clásico para la regulación del ciclo celular que coloca cada complejo de ciclina-CDK en una fase particular del ciclo mitótico (Figura 4). Las ciclinas tipo D se unen a Cdk4 o Cdk6 y controlan la fase G1. Los complejos de ciclina D-CDK fosforilan la proteína del retinoblastoma (pRb) que se encuentra unida al factor de transcripción E2F, lo que conduce a la liberación de E2F que activa la transcripción de los genes necesarios para el paso a la fase S. Las ciclinas de tipo E funcionan durante finales de G1 y en toda la fase S, principalmente en complejos con Cdk2. La ciclina tipo A mitótica, ciclina A2, se sintetiza al inicio de la fase S y, al igual que la ciclina E, se une y activa Cdk2, promoviendo así la progresión a través de la fase S a través de la fosforilación de proteínas implicadas en la replicación del ADN. Posteriormente, las ciclinas de tipo B se unen a Cdk1 y conducen la entrada a la fase M, que culmina en la finalización del ciclo celular (Wolgemuth, 2013).

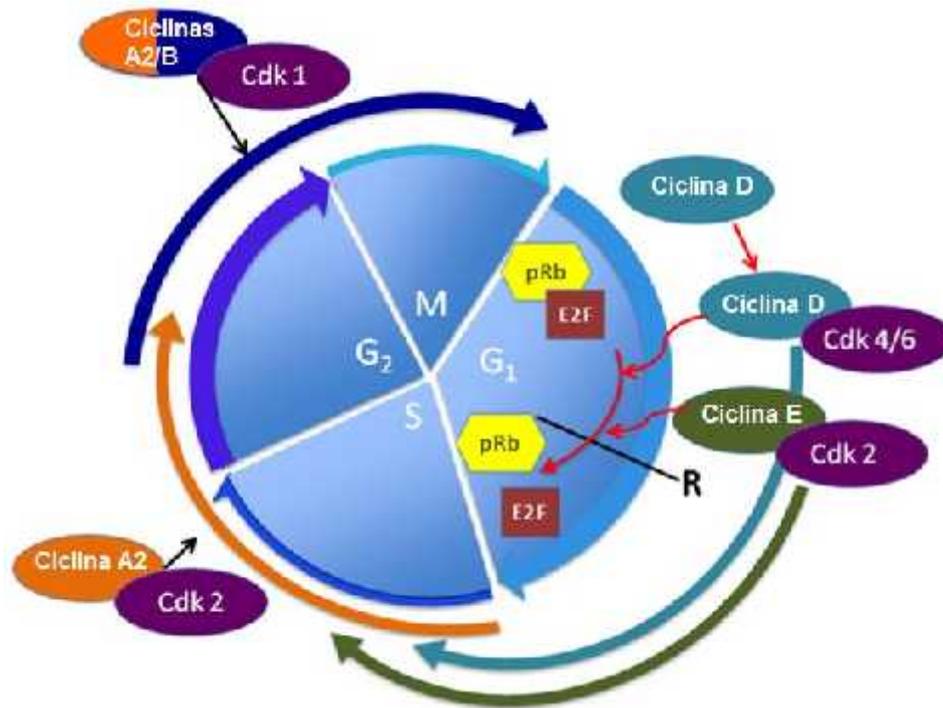


Figura 4. Modelo clásico del ciclo celular en eucariotes superiores por las diferentes ciclinas y cinasas (Modificado de Wolgemuth, 2013).

2.3.3 Las subunidades reguladoras de las cinasas dependientes de ciclina: CKS.

Las subunidades reguladoras de las cinasas dependientes de ciclina (CKS) son proteínas pequeñas (9–18 kDa) reguladoras del ciclo celular que comparten una alta identidad de secuencia y son esenciales para la viabilidad celular (Bourne et al., 2000).

2.3.3.1 Estructura de la CKS.

La estructura conservada dentro de la familia de CKSs de diferentes organismos comprende una lámina β -antiparalela de cuatro cadenas y dos α -hélices cortas (Bourne et al., 2000).

Alineamientos de secuencia en la familia de CKSs revelan regiones conservadas que, a través de estudios de mutagénesis, modelaciones estructurales y cristalografía se ha demostrado que son fundamentales para la función de estas proteínas (Bourne et al., 1996, McGrath et al., 2013). A continuación, aparecen especificadas dichas regiones:

Bolsillo catiónico: Clúster conservado de aminoácidos altamente positivos que forma un sitio de unión al anión fosfato (Bourne et al., 1996). Estudios de modelación estructural han sugerido que este bolsillo catiónico es parte de una

superficie continua que incluye el sitio activo de las CDKs y las ciclinas, por lo que se plantea que a través de esta región las CKSs intervienen en el reconocimiento y unión a substratos fosforilados (Figura 3) (Arvai et al., 1995; McGrath et al., 2013).

Clúster hidrofóbico: Clúster conservado de residuos hidrofóbicos que forman la región de contacto entre las proteínas CKSs y las CDKs (Bourne et al., 1996; McGrath et al., 2013).

Motivo bisagra : Motivo conservado que tiene la estructura HXPEPH (donde X es cualquier residuo), es el punto de contacto para la formación de las estructuras de dímeros intercambiados característicos de las CKSs. Tiene relevancia también en la interacción de las proteínas CKS con la CDK (Bourne et al., 1996; Rousseau et al., 1998).

Las proteínas CKSs de *S. pombe* y *S. cerevisiae* en particular tienen, además, dos grandes inserciones de una larga α -hélice en el extremo N-terminal y un gran bucle entre las otras dos α -hélices (Seeliger et al., 2002).

En diferentes miembros de la familia de las proteínas CKSs se ha observado, además de la proteína monomérica, la formación de dímeros y hexámeros (Seeliger et al., 2002). Las formas oligoméricas, resultan del intercambio de las hebras C-terminales, 4 de cada monómero de CKS para formar un dímero (Figura 5) (Bourne et al., 1996, Seeliger et al., 2002). Las estructuras monoméricas y oligoméricas son superponibles con excepción de un giro entre la hebra 3 y la hebra 4 que actúa como una bisagra molecular y se abre en una conformación extendida en el dímero (Seeliger et al., 2002). Estudios de cristalografía en CKSs de diferentes organismos como: *S. pombe* (Khazanovich et al., 1996); *S. cerevisiae* (Bourne et al., 2000; Balog et al., 2011) y *H. sapiens* (Bourne et al., 1996) demuestran la flexibilidad de la región de la bisagra que tiene además una secuencia aminoacídica conservada en todas las CKSs (HXPEPH). Se ha demostrado a través de experimentos de mutagénesis que los dos residuos de prolina conservados en la bisagra son determinantes en el favorecimiento de la forma monomérica o la forma dimerica en la proteína: la mutación de la primera o segunda prolina favorece de manera estricta el monómero o dímero, respectivamente, mientras que la mutación de cualquier otro residuo en el bucle de bisagra tiene poco efecto sobre el equilibrio monómero-dímero (Seeliger et al., 2005; Balog et al., 2011)

El equilibrio entre monómero y dímeros C-terminal intercambiados también se ha observado en la RNAsa pancreática bovina. En un estudio de esta proteína se observó que la isomerización de las prolinas en conformación cis o trans es determinante en el cierre o extensión del dominio que favorece esta estructura (Miller et al., 2010). Por otra parte, se ha demostrado que la prolil isomerasa, la cual pudiera jugar un papel alterando la conformación de bisagra, es esencial para la salida de la mitosis en levaduras (Lu et al., 1996).

El motivo bisagra en su conformación cerrada produce una horquilla intrasubunidad y se pliega hacia el interior de la proteína dando lugar a la forma monomérica como se observó en la CKS de *S. pombe*, p13suc1 (Endicott & Nurse, 1995) y en una de las CKSs de *H. sapiens* CksHs1 (Arvai et al., 1995a). Estudios de cristalografía del complejo CKS-CDK en humano revelaron que la CKS se une al lóbulo C-terminal de la CDK a través de la hoja 4 de su estructura y que en esta unión intervienen directamente las cadenas laterales del clúster hidrofóbico conservado de la CKS más dos residuos conservados de histidina (H) y ácido glutámico (E) situados en la bisagra. Estos residuos importantes están accesibles en la interfaz de unión con la CDK, sólo cuando el motivo bisagra se encuentra en su configuración cerrada y por tanto cuando la CKS se encuentra en forma monomérica (Endicott & Nurse, 1995; Bourne et al., 1996). La apertura de la bisagra propicia la formación del dímero intercambiado entre dos proteínas CKSs y esto impide estéricamente la unión de la CDK. Además, en la conformación abierta de la bisagra los residuos importantes para la interacción con la CDK presentes en la bisagra están comprometidos en la formación del dímero. Igualmente, las cadenas laterales del clúster hidrofóbico conservado quedan secuestradas en una cavidad de manera que no están disponibles para la unión con la CDK (Bourne et al., 1996; Parge et al., 1993).

La naturaleza conservada de la formación de dímeros en proteínas CKSs y el hecho de que solo las CKSs monoméricas pueden unirse a CDK, sugieren que el equilibrio monómero-dímero pudiera ser un mecanismo de regulación de la unión de la CKS a las CDK *in vivo* (Balog et al., 2011).

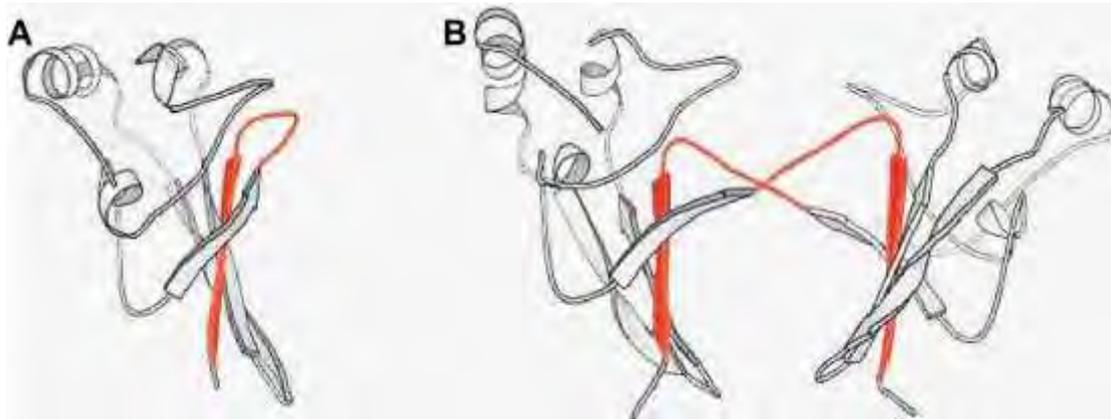


Figura 5. Representación esquemática de un monómero (A) y un dímero de dominios intercambiados (B) de p13suc1. La hebra C-terminal y el motivo de bisagra están señalados en rojo. En el monómero, la bisagra está en su conformación cerrada con la hebra c-terminal hacia el interior de la estructura de la proteína (B) En el dímero, la bisagra está en su conformación extendida y la hebra c-terminal (4) de un monómero interactúa con la estructura del otro y viceversa (B.) (Tomado de Rousseau et al, 2002).

2.3.3.2. Funciones de las CKSs.

Las proteínas CKSs carecen de función catalítica, pero se ha demostrado que se unen a los complejos ciclina-CDK regulando su función y son un componente esencial de la maquinaria del ciclo celular (Bourne et al., 2000). En muchos estudios recientes se ha correlacionado la expresión desregulada de las CKSs con la carcinogénesis y el mal pronóstico del cáncer (Khattar & Thottassery, 2013; Kattar et al., 2015; Xu et al., 2017).

Mientras que la unidad mínima para la actividad cinasa de la CDK *in vitro* parece ser el heterodímero CDK-ciclina, la actividad CDK *in vivo* es dependiente también de las CKSs (Parge et al., 1993). Las CKSs se unen al lóbulo C-terminal de la CDK, en una superficie opuesta al sitio de unión a ciclina (Bourne et al., 1996; McGrath et al., 2013) (Figura 6).

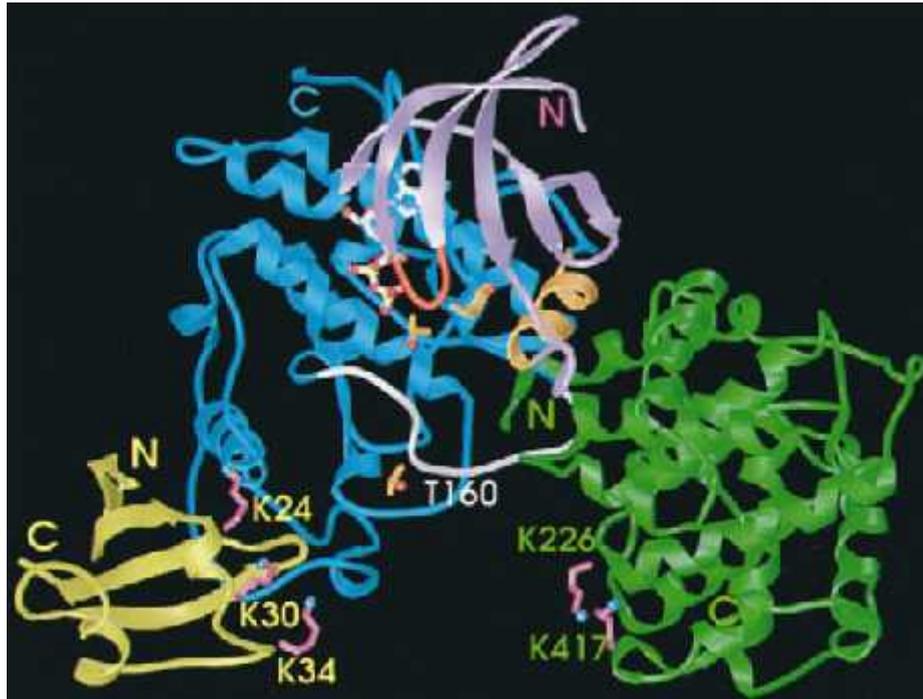


Figura 6. Modelo del complejo ternario CDK2-Ciclina A-CksHs1. CksHs1 (**amarillo**), ciclina A (**verde**), CDK2: Lóbulo N-terminal CDK2(**rosa**) y Lóbulo C-terminal de CDK2 (**azul**). La molécula de ATP se muestra en la interfaz de los dos lóbulos de CDK2 (enlaces blancos con **esferas rojas** representando los átomos de oxígeno). El bucle T (donde se encuentra el residuo activador T-160) está señalado en blanco. Los enlaces de las cadenas laterales que forman los sitios de fosforilación inhibitoria (T-14 y T-15) están representados en **naranja**. Los residuos con carga positiva en el bolsillo catiónico de CksHs1 y en la ciclina A están representados con los **enlaces en rosa** y los átomos de nitrógeno como **esferas azules** (Modificado de Bourne et al., 1996).

El orden y sincronización de los eventos del ciclo celular está controlado por la especificidad de sustrato y diferentes umbrales de actividad de la CDK (Kõivomägi et al, 2013). Se ha identificado a través de estudios proteómicos que, muchos sustratos de la CDK presentan un elevado número de sitios de fosforilación (Holt et al., 2009). Uno de los mecanismos por el que se regulan los niveles de actividad de la CDK generándose direccionalidad y progresión a través de las fases del ciclo celular es la capacidad de fosforilar varios sitios en sus sustratos (fosforilación multisitio) (Fisher, 2012). Este modo de regulación aumenta el nivel de procesamiento de la información en comparación a las modificaciones de un solo sitio, proporcionando un arreglo más amplio de objetivos corriente abajo y mayor capacidad para controlar la función del sustrato (Suwanmajo & Krishnan, 2015). Se ha demostrado que la fosforilación multisitio de sustratos de la CDK es controlada por parámetros fundamentales como las distancias entre los sitios de fosforilación, la distribución de serinas y

treoninas como fosfoaceptores y la posición de los motivos de reconocimiento de las ciclinas. Un componente mediador de este proceso es la proteína CKS como miembro del complejo Ciclina-CDK-CKS (Kõivomägi et al, 2013).

Varios estudios han propuesto un modelo de mecanismo de acción para la CKS en el que esta proteína actúa como un factor de acoplamiento (docking) uniéndose a través de su secuencia de residuos básicos conservados (cationic pocket) a sustratos de CDK que han sido previamente cebados (primed) por fosforilación. Esta unión confiere especificidad por los sustratos de la CDK, aumenta la afinidad de la cinasa por estos y potencia la fosforilación en otros sitios (multisitio) (Krishnan, 2010; Kõivomägi et al, 2013; McGrath et al., 2013) (Figura 7a).

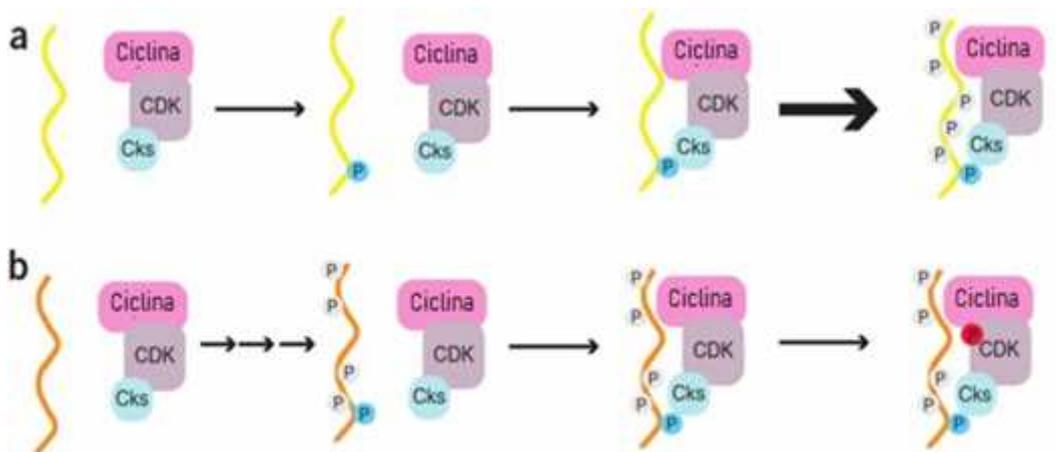


Figura 7. La proteína CKS funciona como un factor de especificidad que media en la asociación sustrato CDK para distintas funciones (Tomado de McGrath et al., 2013) **(A)** La CKS se une a sustratos (amarillo) fosforilados en sitios consenso específicos [fosfato (P en azul)], y el complejo CKS-CDK-sustrato estimula posteriormente la fosforilación en múltiples sitios [fosfatos (P en blanco)]. **(B)** La CKS actúa como un adaptador que dirige la CDK hacia sus reguladores y promueve de esta manera modificaciones postraduccionales en la CDK que regulan su función. [Fosfato (P en rojo)]. (Modificado de McGrath et al., 2013).

El grupo de McGrath y colaboradores (McGrath et al., 2013) caracterizó la estructura por cristalografía de rayos X de la CKS unida a un fosfopéptido de un sustrato de la CDK, identificó secuencias fosforiladas consenso de unión de la CKS y encontró que la hiperfosforilación eficiente de sustratos depende del reconocimiento de elementos de secuencia alrededor del fosfato.

El mismo estudio demostró a través de varias evidencias otro papel de la CKS como proteína accesoria que media la interacción entre las CDK y sus reguladores. De acuerdo con lo observado, se propuso un mecanismo en que la CKS puede unirse a reguladores de la CDK previamente fosforilados

facilitando la interacción de estos con la cinasa y promoviendo de esta manera modificaciones postraduccionales en la misma que regulan su actividad (Figura 7b). Un ejemplo de este mecanismo es la asociación de la CKS con un sitio consenso fosforilado en la proteína cinasa que regula negativamente a la CDK, Wee1 induciendo la fosforilación inhibidora en la proteína CDK (McGrath et al., 2013).

La función como proteína accesoria ha sido evidenciada igualmente en la CKS1 humana la cual se ha demostrado que favorece la interacción entre la proteína SKP2 miembro del complejo ubiquitina ligasa SCF y el inhibidor de la CDK, p27 fosforilado estimulando la ubiquitinación y degradación de este último por miembros del proteosoma (Ganoth et al, 2001).

2.3.3.2.1. CKS en la entrada a la fase S.

En varios estudios ha sido demostrado el papel regulador de una de las dos CKSs parálogas de humanos, CksHs1, en la transición a la fase S (Spruck et al., 2001; Ganoth, 2001). La CksHs1 interactúa con la proteína asociada a cinasa de la fase S (Skp2) la cual es parte del complejo multiprotéico con función ubiquitina ligasa, SCF (Skp1, Cullin, familia F-box). Skp2 y CksHs1 a su vez se unen a p27, un regulador negativo de la transición G1-S que actúa como inhibidor de los heterodímeros ciclina E-CDK2 y ciclina A-CDK2. Estas interacciones propician la transferencia eficiente de ubiquitina hacia p27 por el complejo SCF y la posterior degradación del inhibidor por el proteosoma permitiendo que las CDKs activas conduzcan a la célula hacia la fase S (Harper, 2001; Krishnan et al., 2010). De manera interesante, se observó además que la otra proteína de humanos CksHs2 no se une a Skp2 y no estimula la ubiquitinación del inhibidor p27 (Spruck et al., 2001). La función específica de CksHs2 en la regulación de otra etapa del ciclo celular aun no ha sido identificada.

En *S. cerevisiae* la Cks1 estimula la fosforilación en múltiples sitios de Sic1, un inhibidor del complejo Cdk1-Clb5 que regula la transición G1/S. Esta fosforilación la lleva a cabo Cdk1-Cln2 y la propia Cdk1-Clb5. Dicho proceso da lugar a la degradación del inhibidor Sic1 mediada por la ubiquitina ligasa SCF y el proteosoma. La liberación de Cdk1-Clb5 promueve el inicio de la fase S (Kõivomägi et al., 2011).

2.3.3.1.2. CKSs en la transición de la fase G2/M.

La entrada a la mitosis en células eucariontes está controlada por el heterodímero Cdc2/ciclinaB, también conocido como factor promotor de la maduración (MPF) (Patra & Dunphy, 1998). Durante la interfase, Cdc2 se mantiene inactiva debido a fosforilaciones inhibitorias en los residuos Y-15 y T-14. Estas modificaciones son catalizadas por las cinasas Wee1 y Myt1 respectivamente (Figura 8A). La fosfatasa de especificidad dual Cdc25 remueve ambos fosfatos inhibitorios cuando las condiciones son apropiadas para la mitosis, activando de esta manera a Cdc2 (Figura 8B). En la mitosis, Cdc25 se activa, así como Myt1 y Wee1 se inactivan a través de la fosforilación por múltiples cinasas, incluida la propia Cdc2 (Patra & Dunphy, 1998; Krishnan et al., 2010).

Existen hallazgos que sustentan el papel de la CKS en el mecanismo de regulación de la transición G2/M antes descrito. En extractos de huevos de *Xenopus laevis*, la pérdida de la CKS (denominada Xe-p9 en este organismo) impide la entrada a la mitosis y se observó que mantienen la CDK1 fosforilada en el residuo inhibitorio de Tyr-15 (Patra et al., 1999).

También en *X. laevis* y *S. cerevisiae* se ha demostrado que la CKS promueve la fosforilación multisitio, dependiente de MPF, de los reguladores mitóticos Cdc25, Wee1 y Myt1 (Patra et al., 1999; McGrath et al., 2013).

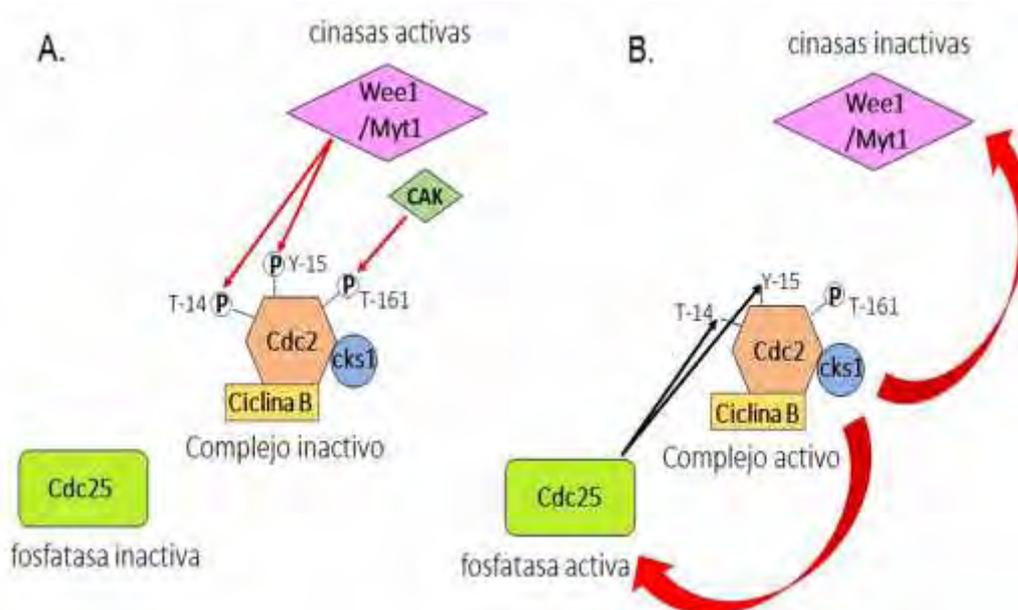


Figura 8. Papel de CKS en la activación de Cdc2 (A) Cdc2 se mantiene inactiva durante la interfase debido a las fosforilaciones inhibitorias en los residuos Y-15 y T-14 por las cinasas Wee1 y Myt1. Cdc2 se activa por la desfosforilación de estos residuos inhibitorios por la fosfatasa Cdc25 la cual se mantiene inactiva durante la interfase. La activación completa de Cdc2 requiere también de la fosforilación en el residuo T-161 de Cdc2. (B) Cks1 promueve la fosforilación dependiente de MPF(Cdc2-ciclinaB) de Cdc25, y de Wee1/Myt1. Al ser fosforiladas, Cdc25 se activa mientras que Myt1/Wee1 se inactivan. Esto conduce a la desfosforilación de los residuos inhibitorios, la activación del complejo MPF y por tanto el desencadenamiento de las funciones de esta para promover la entrada a la mitosis. Adicionalmente la activación de la transcripción de Cdc2 y ciclina B dependiente de Cks1 puede también contribuir a la entrada a la mitosis. Flechas rojas: Fosforilación; Flechas negras: Desfosforilación; Letra P: Grupo Fosfato (Modificado de Krishnan, 2010). Para aportar más uniformidad, en la ilustración de este artículo fueron utilizados los nombres generales Cks1 y Cdc2 refiriéndose a los homólogos de Cks1 y Cdc2 respectivamente en diferentes especies.

2.3.3.1.3. CKSs en la transición de metafase a anafase.

Una vez que las células entran en mitosis la progresión depende de la activación dependiente de MPF de la ubiquitina ligasa denominada complejo promotor de la Anafase / Ciclosoma (APC/C). En particular, la salida de la mitosis requiere la ubiquitinación mediada por APC/C de la ciclina B y la posterior degradación por el proteosoma (Van Zon et al., 2010).

Se han sugerido diferentes mecanismos moleculares a través de los cuales las proteínas CKSs llevan a cabo la degradación de ciclina B. Un estudio con CKS de *X. laevis* (Xep9) evidenció que esta proteína, a través de su función de acoplamiento molecular promueve la fosforilación in vitro dependiente de MPF de dos subunidades (Cdc27 y BIME) del complejo APC/C (Patra & Dunphy, 1998). Igualmente fue comprobado que la CKS de la levadura *S. pombe*, *p13Suc1*, se asocia con APC/C fosforilada y activa (Sudakin et al., 1997). Además, se demostró en humanos que la CKS facilita la unión de la ciclina B al APC/C fosforilado, haciéndola un mejor substrato para su ubiquitinación (Van Zon et al., 2010). Estos hallazgos apoyan la idea de que la CKS promueve la degradación de ciclina B y de esta manera el paso de metafase a anafase a través de la activación de la APC/C. Por tanto, un mecanismo propuesto es que las CKSs estimulan la fosforilación de la ubiquitina ligasa APC/C activándola. Además, facilitan la interacción ciclina B-APC/C activa para su ubiquitinación y posterior degradación por el proteosoma (Figura 9B).

Por otra parte, Kaiser et al. (1999) demostraron que la degradación de la ciclina B mediada por la CKS de *S. cerevisiae* (Cks1) se puede efectuar a través de su interacción directa con los componentes del proteosoma 19S (Rpn3, Rpt1 y Rpt6) (Figura 9C). Igualmente, este estudio propone otra vía por la que Cks1 regula la transición de metafase-anafase. Fue comprobado que la Cks1 media la degradación de Pds1, un inhibidor de la Anafase en *S. cerevisiae*. El mecanismo transcurre a través de la activación de la APC/C y de la posterior degradación por el proteosoma 26S la cual es esencial para el inicio de la separación de cromátidas hermanas.

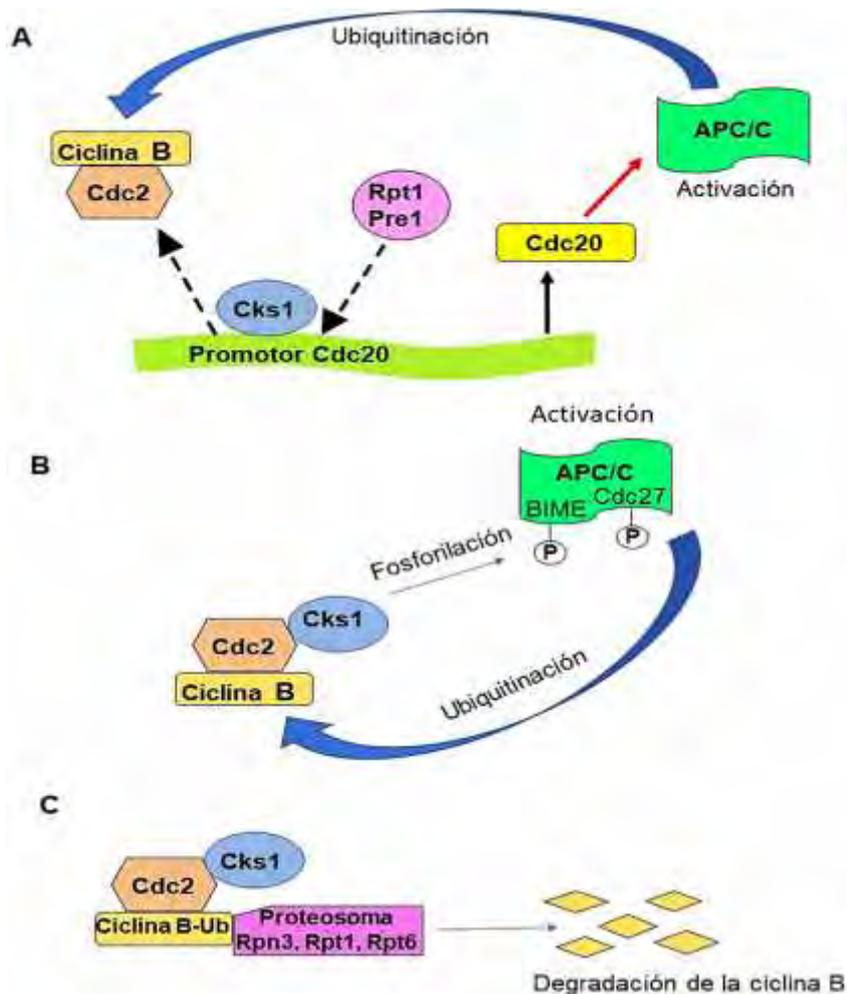


Figura 9. Papel de la Cks1 en la degradación de la ciclina B y la transición de metafase a anafase. (A) Cks1 promueve la transcripción de Cdc20. Esta función de Cks1 implica la disociación de Cdc2 y el reclutamiento de los componentes del proteosoma 19S y 20S (Rpt1 y Pre1, respectivamente) al promotor de Cdc20. Cdc20 a su vez activa APC/C para la ubiquitinación de ciclina B. (B) Cks1 estimula la fosforilación de los componentes de la APC/C (Cdc27 y BIME) activándola para la ubiquitinación de ciclina. (C) Cks1 interactúa directamente con los componentes del proteosoma 19S (Rpn3, Rpt1 y Rpt6) y ayuda a presentar la ciclina B ubiquitinada al proteosoma (Modificado de Krishnan, 2010). Para aportar más uniformidad, en la ilustración de este artículo fueron utilizados los nombres generales Cks1 y Cdc2 refiriéndose a los homólogos de Cks1 y Cdc2 respectivamente en diferentes especies.

2.3.3.1.4. CKS como regulador de la transcripción.

La CKS también ha sido implicada en la regulación transcripcional. De hecho, algunos de estos roles transcripcionales también indican otras formas en que la CKS podría estar involucrada en la regulación de las transiciones del ciclo celular. Por ejemplo, se ha demostrado que Cks1 de *S. cerevisiae* está involucrada en la transcripción eficiente de Cdc20 (activador de APC/C). Esta transcripción específica está asociada con el reclutamiento de los componentes del proteosoma (Rpt1, Pre1) a la región promotora de Cdc20. Además, Cks1 se

requiere para la disociación periódica de Cdc2 de la región del promotor Cdc20 relacionada con la transcripción de este gen (Morris et al., 2003). Por lo tanto, es probable que, además de la degradación de ciclina B, la transcripción de Cdc20 también esté implicada en los mecanismos básicos que subyacen a la regulación mitótica dependiente de Cks1 (Figura 9A) (Morris et al., 2003). También se ha demostrado que Cks1 regula transcripcionalmente la expresión de Cdc2, ciclina B y ciclina A en células de mamíferos (Westbrook et. al., 2007; Martinsson-Ahlzen et al., 2008).

En *S. cerevisiae* se encontró que Cks1 interactúa directamente con Rtf1, un componente del complejo Paf1 (factor 1 asociado a ARN polimerasa II) y que esta interacción es esencial para el reclutamiento eficiente de Cks1 a la cromatina para la inducción del gen *GAL1*. Además, se demostró que Cks1 sirve como un adaptador que permite a Rtf1 reclutar partículas del proteosoma 19S que ha sido comprobado que son necesarias para la transcripción de algunos genes rápidamente inducibles como *GAL1*. Algunos componentes del proteosoma 19S involucrados poseen actividad ATPasa (Bedford et al., 2010) y se sugirió que el complejo Rtf1-Cks1-proteosoma 19S actúa particularmente cuando la inducción rápida de genes requiere energía para el desalojo de nucleosomas (Figura 10) (Pan et al., 2013).

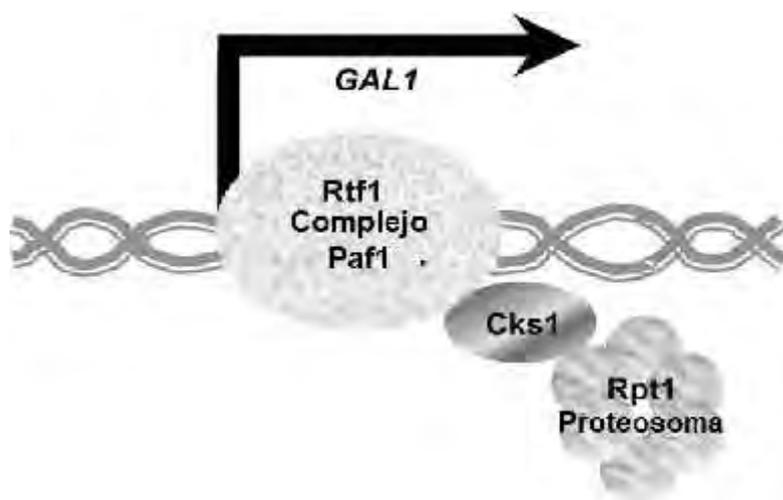


Figura 10. Modelo de transcripción mediada por Cks1 (Tomado de Pan et al., 2013). Se ha propuesto que Cks1 funciona como un adaptador que interactúa con Rtf1, una proteína que forma parte del factor 1 asociado a ARN polimerasa II (Paf1). Además, Cks1 se une a Rpt1, un componente de la subunidad 19S del proteosoma. Estas interacciones activan la transcripción del gen *GAL1* (Modificado de Pan et al., 2013).

2.3.3.3 Papel de las CKSs en el ciclo celular de organismos modelos.

La mayoría de las investigaciones sobre la proteína CKS han sido llevadas a cabo en levaduras y mamíferos. No obstante, existen estudios en los que han sido utilizados otros sistemas como *X. laevis* (Patra & Dunphy, 1998; Patra et al., 1999), *C. elegans* (Polinko & Strome, 2000), *D. melanogaster* (Swan et al., 2005; Ghorbani et al., 2011), *Arabidopsis thaliana* (Boudolf et al., 2001) y parásitos como: *L. mexicana* (Mottran & Gram, 1996) y *T. cruzi* (Muñoz et al., 2006).

Según las investigaciones en estos organismos, se ha determinado que los eucariontes inferiores (levaduras y parásitos) y la planta *Arabidopsis thaliana* tienen una sola proteína CKS. Los metazoarios como: *H. sapiens*, *D. melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* tienen dos genes que codifican para dos proteínas con alta similitud.

La CKS se identificó inicialmente en 1986 en *S. pombe* por su capacidad para rescatar mutantes de CDK de *S. pombe* (Cdc2) sensibles a temperatura (Hayles et al., 1986a). Esta CKS fue denominada p13suc1, está constituida 113 aminoácidos y tiene un peso molecular de 13 kDa (Hindley et al., 1987). Posteriores estudios bioquímicos revelaron su papel esencial en la regulación del ciclo celular (Hayles et al.; 1986b; Hindley et al., 1987). En *S. pombe* la pérdida de función de p13suc1 detiene la levadura en la mitosis mientras que su sobreexpresión la arresta en la fase G2 (Hayles et al., 1986b).

Igualmente, la CKS homóloga en *S. cerevisiae*, con un peso molecular de 18 kDa, fue identificada por su interacción con la CDK de este organismo (Cdc28), de ahí la designación de Cks1 (Cdc28 kinase subunit 1) (Hadwiger et al, 1989). La sobreexpresión de Cks1 lleva a un retraso en la fase G2, mientras que la deficiencia de esta proteína mantiene a las células detenidas en G2 (a diferencia de lo que sucede en p13suc1) (Tang & Reed., 1993).

Tanto la p13suc1 como Cks1 muestran una identidad de secuencia de aminoácidos del 67%, siendo una diferencia la presencia de 16 codones de glutamina consecutivos adicionales en el gen *CKS1* de *S. cerevisiae* (Hadwiger, 1989). Ambas CKSs se han observado en formas monoméricas y formando dímeros de dominios intercambiados (Bourne et al, 2000). En el caso de la Cks1, a diferencia de lo reportado para el resto de los miembros de la

familia CKS, estos dímeros tienen disposición antiparalela de las subunidades monoméricas. Además, se estabilizan por un puente disulfuro entre las dos subunidades como resultado de la interacción entre el residuo de Cisteína (C) 90 situado anterior al motivo bisagra de cada monómero (Bourne et al., 2000).

A pesar de las diferencias se ha demostrado por complementación que las dos proteínas de levadura son homólogos funcionales (Richardson et al., 1990).

Los ortólogos humanos, denominados CksHs1 y CksHs2, son considerablemente de menor tamaño que las CKSs de las levaduras, conformados por 79 aminoácidos y con un peso molecular de 9 kDa. Son proteínas altamente relacionadas con 81% de identidad. CksHs1 comparte un 53% de identidad con Cks1 y p13Suc1 mientras que CksHs2 comparte un 57% de identidad con cada uno de los homólogos de levadura (Richardson et al., 1990).

Las principales diferencias en longitud entre las CKSs de levaduras y humanas están dadas por la existencia de dos extensiones en los extremos N y C-terminales y una inserción de 9 aminoácidos en las primeras no encontradas en las segundas (Bourne et al., 1996). Sin embargo, prácticamente todos los residuos responsables de interacciones estructurales críticas se conservan. Fue demostrado que tanto CksHs1 y CksHs2 fueron capaces de compensar una mutación nula del gen Cks1 en *S. cerevisiae* (Richardson et al., 1990).

A pesar de su marcada identidad de secuencias CksHs1 y CksHs2 tienen diferencias a más altos niveles de organización estructural. Aunque teóricamente tanto CksHs1 como CksHs2 pueden existir en formas monoméricas y diméricas in vitro, parece que CksHs1 es más estable en forma monomérica mientras que CksHs2 se observa en formas principalmente diméricas e incluso hexaméricas (Arvai et al., 1995).

Igualmente, entre CksHs1 y CksHs2 existen diferencias funcionales. Se ha demostrado que CksHs1, a diferencia de CksHs2, puede estimular la degradación proteolítica del inhibidor de la CDK, p27(Kip) mediando en la unión de este con SKP2 (componente del complejo ubiquitina ligasa SCF) (Ganoth et al., 2001). Por otra parte, mientras que la expresión de CksHs1 alcanza su máximo en la fase S, la de CksHs2 alcanza su máximo en las fases G2/M. (Richardson et al., 1990).

D. melanogaster tiene dos genes homólogos de CKS, denominados cks30 y Cks85A. Se ha demostrado que CKS85A, a diferencia de Cks30, es esencial para la viabilidad de este organismo (Ghorbani et al., 2011). Entre sus funciones, se ha comprobado que interviene en el crecimiento y en el mantenimiento de la diploidía en células en mitosis (Ghorbani et al., 2011). Por otra parte, CKS30 juega un papel en la meiosis y mitosis en estado embrionario (Swan et al., 2005). Se ha demostrado que Cks30A no puede compensar funcionalmente la pérdida de Cks85A (Ghorbani et al., 2011).

Polinko y Strome, (2000) identificaron en *C. elegans* dos homólogos de CKS: CKS-1 y CKS-2. Utilizando ARN de interferencia para investigar sus funciones en el desarrollo, demostraron que mientras que el silenciamiento del gen cks-2 no muestra defectos aparentes, la interferencia del gen cks-1 afecta tanto la meiosis como la mitosis.

En *L. mexicana* fue identificada una CKS de peso molecular de 12 kDa denominada p12cks1. Esta CKS mostró un 70% de identidad con la CksHs1 de humano y un 44% de identidad con p13suc1 de *S. pombe*. En este estudio se observó que p12cks1 puede interactuar con Cdc2 de *S. pombe* demostrando la homología funcional con p13suc1. Además, se encontró que existía interacción con CRK1 y SBCRK1 que son cinasas relacionadas con Cdc2 (CRKs) propias de estos parásitos (Mottram y Gram, 1996).

Por otra parte, Muñoz et al., (2006) identificaron la proteína Tcp12CKS1, un miembro de la familia CKS en *T. cruzi*. En este estudio se observó que Tcp12CKS1 interactúa con dos CRKs de *T. cruzi* (TcCRK1 y TcCRK3) en la etapa de epimastigote del parásito. Además, se demostró que Tcp12CKS1 pudo rescatar una mutante nula de p13SUC1 en *S. pombe*.

2.3.3.4. CKS en *T. vaginalis*.

En un trabajo previo de nuestro laboratorio fueron identificados dos genes que están anotados en la base de datos del genoma de *T. vaginalis* www.trichdb.org (números de acceso TVAG_164620 y TVAG_142260) como codificadores de CKSs putativas y fueron denominados *Tvcks1* y *Tvcks2*. Las dos proteínas codificadas por estos genes se denominaron TvCKS1 y TvCKS2. Cada una de las TvCKSs están compuestas por 82 aminoácidos, con un peso molecular teórico de 10 kDa. Estas proteínas tienen 94% de identidad y de 96%

de similitud entre ellas, diferenciándose únicamente en 5 aminoácidos. Entre estas variaciones hay dos cambios de aminoácidos conservativos y tres no conservativos. A pesar de ser una diferencia aparentemente mínima, estos aminoácidos están ubicados en regiones importantes para la función de las CKSs como: el clúster hidrofóbico y el motivo bisagra (Figura 11) (Morales, 2015; Amador et al., 2017).

A través del método de doble híbrido se demostró, que dos CRKs de *T. vaginalis* (TvCRK1 y TvCRK2) interactúan con ambas TvCKSs sugiriendo el posible papel de estas últimas como reguladores del ciclo celular a través de la interacción con las TvCRKs (Amador et al., 2017).

El método de doble híbrido no permitió evaluar la formación de homodímeros y heterodímeros de TvCKS1 y TvCKS2. Esto se debió a que los controles, que eran cada una de estas proteínas unidas a un sitio de unión a DNA, podían activar por sí solos la transcripción en levadura. Estos resultados preliminares sugieren una posible función de las CKSs de *T. vaginalis* en la activación de la transcripción (Morales, 2015).

Un análisis bioinformático de la estructura de estas proteínas reveló que tanto TvCKS1 como TvCKS2 tienen mayor identidad (>50 %) y similitud (70%) con los ortólogos humanos CksHs1 y CksHs2 en comparación con otros organismos. Sorprendentemente, la identidad y similitud con las CKSs de otros protozoarios y de levaduras fue mucho menor (Tabla 1) (Morales, 2015). No obstante, existe una alta conservación de las regiones que se han descrito como de mayor relevancia para la función de estas CKSs (Figura 11).

Las TvCKSs tienen el motivo HXPEPH que es característico de las CKSs descritas hasta el momento. En TvCKS1 este motivo se compone de: His-60, Ala-61, Pro-62, Glu-63, Pro-64 y Asn-65. En TvCKS2 el motivo es el mismo excepto por Asn-61. En las dos proteínas el último aminoácido del motivo de dimerización es una asparagina en lugar de una histidina. Se conservan también los cinco aminoácidos involucrados en la unión a fosfato: Lys-11, Arg-20, Ser-51, Trp-54 y Arg-71, y la mayoría de los aminoácidos necesarios para la interacción con las CDKs (Morales, 2015).

Tabla 1. Porcentajes de identidad y similitud de las TvCKSs con CKSs de otros organismos (Modificado de Morales N., 2015).

Proteína	Organismo	Proteína putativa de <i>T. vaginalis</i>	*Probabilidad	Identidad	Similitud
CksHs1	<i>H. sapiens</i>	TvCKS1	3.0e-22	56%	73%
		TvCKS2	4.9e-22	55%	73%
CksHs2	<i>H. sapiens</i>	TvCKS1	4.8e-24	57%	76%
		TvCKS2	7.8e-24	56%	76%
LmmCKS1	<i>L. mexicana</i>	TvCKS1	4.9e-22	39%	54%
		TvCKS2	1.0e-21	37%	55%
Cks1	<i>S. cerevisiae</i>	TvCKS1	3.0e-21	28%	40%
		TvCKS2	1.0e-19	27%	38%
p13SUC1	<i>S. pombe</i>	TvCKS1	3.7e-17	36%	55%
		TvCKS2	1.6e-16	36%	52%
TbCKS1	<i>T. brucei</i>	TvCKS1	3.8e-22	42%	44%
		TvCKS2	4.4e-21	39%	54%
Tcp12CKS1	<i>T. cruzi</i>	TvCKS1	1.2e-20	38%	55%
		TvCKS2	2.7e-21	39%	57%

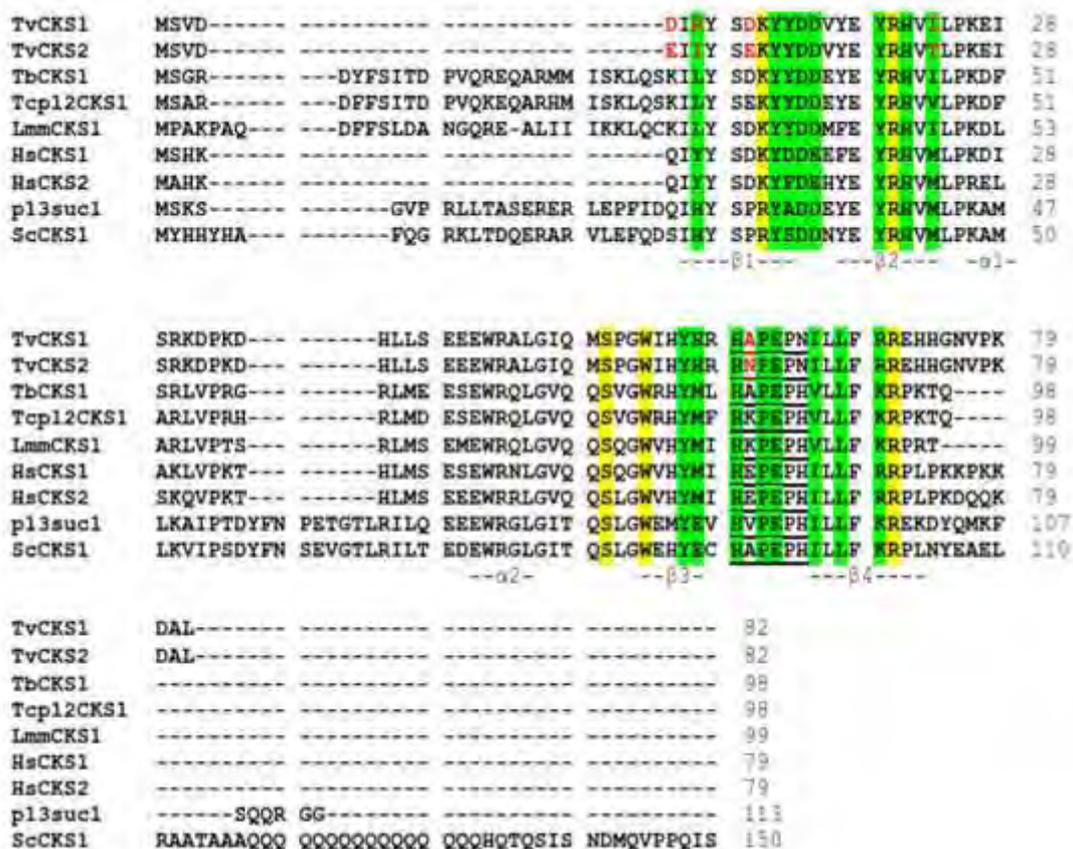


Figura 11. Alineamientos de las CKSs de distintos organismos. Residuos necesarios para la interacción con las CDKs (Verde), Residuos involucrados en la unión a fosfato (Amarillo), motivo bisagra (HXPEPH) (Subrayado); aminoácidos que difieren entre TvCKS1 y TvCKS2 (Señalados en rojo). Cambios conservativos de aminoácidos entre TvCKS1 y TvCKS2: El aspartato (D) 5 y 10 en TvCKS1 cambian por glutamato (E) 5 y 10 en TvCKS2. Cambios no conservativos: La Arginina (R) 7, la Isoleucina(I)23 y Alanina(A) 61 en TvCKS1 cambian por Isoleucina (I) 7, Treonina (T)23 y Asparagina (N)61 en TvCKS2 . Tv- *T. vaginalis* Tb- *T. brucei*

Tc. *T. cruzi*. Lmm. *L. mexicana* Hs- *H. sapiens* Sc- *S. cerevisiae* (Modificado de Morales N., 2015).

Los estudios precedentes sobre las TvCKSs sugieren que pudieran ser reguladores del ciclo celular en *T. vaginalis*. No obstante, la función de estas proteínas no fue definida en investigaciones anteriores.

La complementación funcional de mutaciones en levaduras por proteínas heterólogas homólogas es una práctica estándar para el análisis funcional de estas. Generalmente se emplea cuando la interrupción/mutación en estos genes de levaduras proveen una diferencia fenotípica a nivel celular (Lavigne & Volckaert, 2007).

2.4. Justificación

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados y conociendo que *S. cerevisiae* presenta un único gen *Cks1* que es esencial para la viabilidad celular, en este trabajo nos hemos propuesto evaluar las proteínas TvCKS1 y TvCKS2 desde el punto de vista funcional a través del método de complementación en la levadura *S. cerevisiae* diploide mutante nula deficiente en un alelo del gen *CKS1*. De esta manera y a través de la evaluación de la formación de dímeros, profundizaremos en la caracterización de las TvCKSs, posiblemente implicadas en la regulación del ciclo celular de *T. vaginalis*, uno de los temas de investigación de nuestro laboratorio.

2.5. Hipótesis:

Las proteínas TvCKS1 y TvCKS2 de *T. vaginalis* son homólogos funcionales de la proteína *Cks1* de *S. cerevisiae*.

Para probar esta hipótesis se trazaron los siguientes objetivos:

2.6. Objetivo general:

Realizar la caracterización funcional de las proteínas TvCKS1 y TvCKS2 de *T. vaginalis* en *S. cerevisiae*.

2.6.1. Objetivos específicos:

1. Evaluar la funcionalidad de las proteínas TvCKS1 y TvCKS2 de *T. vaginalis* mediante un ensayo de complementación en una levadura diploide mutante para uno de los alelos del gen *CKS1*.

1.1. Construir la levadura mutante diploide *S. cerevisiae* *CKS1/cks1* :: *KanMX*.

1.2. Transformar la mutante de *S. cerevisiae* con los plásmidos pYES2-*Tvcks1*, pYES2-*Tvcks2*, pYES2-*CKS1* y pYES2. Seleccionar las células transformantes URA+.

1.3. Análisis de levaduras haploides para definir si existe complementación, mediante los métodos de:

1.3.1 Disección de tétradas

1.3.2 Esporas al azar.

2. Evaluar *in vitro* la formación de homodímeros de TvCKS1 y TvCKS2.

3. Metodología.

Para probar la función de las proteínas TvCKS1 y TvCKS2 se siguió la estrategia de complementar la función de Cks1 en una levadura mutante. En primer lugar, se obtuvo una levadura (*S. cerevisiae*) diploide mutante la cepa de *S. cerevisiae* con uno de los alelos del gen *CKS1* reemplazado por el gen *KanMX* de resistencia a Geneticina. Esta mutante se transformó independientemente con los plásmidos que contienen los genes *Tvcks1* y *Tvcks2* (pYES2-*Tvcks1* y pYES2-*Tvcks2*). A continuación, se indujo la esporulación de las transformantes obtenidas, cultivándolas en un medio pobre en nutrientes. La identificación genotípica de las colonias haploides obtenidas se realizó por los métodos de disección de tétradas en el caso del control positivo y debido a problemas técnicos se continuó evaluando el resto de las muestras por el método de esporas azar. Se corroboró este análisis por PCR para confirmar el genotipo identificado a través de los métodos mencionados. Se esperó como resultado positivo de complementación que las levaduras haploides mutantes *cks1* ::*KanMX* que contienen las construcciones con los genes a evaluar (*Tvcks1* y *Tvcks2*) sean viables.

3.1. Generación de la mutante *S. cerevisiae* *CKS1/cks1* ::*KanMX*.

3.1.1. PCR para la amplificación del módulo *KanMX* con secuencias flanqueantes al gen *CKS1* de *S. cerevisiae*.

A partir del plásmido pFA6KANMX4 (Wach et al., 1994) se amplificó el módulo *KanMX* unido a secuencias de 42 nucleótidos río arriba y río abajo que corresponden a las regiones que flanquean el gen *CKS1* de *S. cerevisiae* empleando para ello los oligonucleótidos *KanMX.CKS1-Fo* y *KanMX.CKS1-Re* (Anexo I). La amplificación de este fragmento se llevó a cabo con el propósito de reemplazar un alelo del gen *CKS1* por el módulo de resistencia a Kanamicina *KanMX* a través de recombinación homóloga. El vector pFA6KANMX4 fue diseñado para la inactivación de genes de *S. cerevisiae* mediante la transfección de levadura con productos de PCR (Wach et al., 1994). El módulo *KanMX* contiene la secuencia codificadora para el marco de lectura abierta que codifica para el gen que confiere resistencia a Kanamicina presente en el transposon de *E. coli* Tn903 fusionado a las secuencias de control transcripcional y traduccional del gen *TEF* del hongo filamentoso

Ashbya gossypii. Este módulo permite la selección eficiente de mutantes con Geneticina (Wach et al., 1994). La reacción de PCR se realizó en las siguientes condiciones:

Tabla 2. - Mezcla para PCR de amplificación del módulo KanMX con secuencias flanqueantes al gen CKS1.

Solución	Muestra	Control
Amortiguador para PCR 10X	1X*	1X*
MgSO ₄ 50mM	1 mM*	1 mM*
dNTPs 10 mM	0.3 mM*	0.3 mM*
Oligo KanMX.CKS1-Fo 100 ng/μL	2 ng/μL*	2 ng/μL*
Oligo KanMX.CKS1-Re 100 ng/μL	2 ng/μL*	2 ng/μL*
Plásmido pFA6KANMX4 100 ng/ μL	2 ng/μL*	-
Pfx DNA pol (2.5 U/μL)	1 U *	1 U *

(* concentración final en la mezcla de reacción)

Tabla 3. Programa utilizado para el PCR de amplificación del módulo KanMX con secuencias flanqueantes al gen CKS1.

Paso	Tiempo	Temperatura
1	5´	94 °C
2	30´´	94 °C
3	15´´	60 °C
4	2´	68 °C
5	6 ciclos (2-4)	
6	15´´	94 °C
7	15´´	62 °C
8	2´	68 °C
9	30 ciclos (6-8)	
10	5´	68 °C
11	12 °C	1 h
Total	200 μL	25 μL

El producto de PCR fue purificado mediante el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) siguiendo las instrucciones recomendadas por el proveedor. Dos eluciones fueron analizadas por electroforesis en un gel de agarosa 1%. Cada elución fue cuantificada por espectrofotometría UV a 260 nm.

3.1.2. Transformación de la levadura diploide *S. cerevisiae* con el módulo KanMX unido a secuencias flanqueantes al gen *CKS1*.

Se hizo un cultivo de *S. cerevisiae* BY4743 (*MATa/ his3 1/his3 1 leu2 0/leu2 0 LYS2/lys2 0 met15 0/MET15 ura3 0/ura3 0*) en 10 mL de YPD (Anexo II) y se incubó 12 horas a 30°C. Posteriormente se centrifugó el cultivo a 1,157 g por 5 minutos, se desechó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en 10 mL de agua bidestilada estéril. Se inoculó 2.5 mL de esta suspensión en 50 mL de YPD y fue incubado a 30°C en agitación hasta alcanzar una D.O. de 0.3. A continuación, se centrifugó a 1,157 g por 5 minutos y se desechó el sobrenadante. Se lavó el precipitado con 1 mL de agua bidestilada estéril y se repitió esta operación con 800 µL de solución TEL (Anexo III). El precipitado se resuspendió en 200 µL de solución TEL y se emplearon 50 µL de células por cada transformación a los que se adicionó 50 ng del producto de PCR obtenido como se describe en la sección 3.1.1., 10 µL de DNA de esperma de salmón (Anexo III) y 300 µL de TELP (Anexo III). Se mezcló en vórtex y se incubó a 30°C en agitación por 30 minutos. Se añadieron 40 µL de DMSO, se agitó con vórtex y se incubó a 42°C durante 15 minutos. Se centrifugó a 18,407 g por 10 segundos, se resuspendió el precipitado en 4 mL de YPD y se incubó en agitación a 30°C por 3 horas. Nuevamente se centrifugó a 25,200 g por 10 segundos, el precipitado se resuspendió en 100 µL de YPD y se plateó en cajas de YPD sólido con Geneticina (200 µg/mL). Las cajas fueron incubadas por 2 o 3 días a 30°C. Cada colonia transformante obtenida fue purificada estriando por agotamiento en YPD sólido con Geneticina.

3.2. Caracterización de la mutante *S. cerevisiae* *CKS1/cks1 ::KanMX*.

3.2.1 Extracción de DNA genómico de levadura.

Para comprobar la obtención de la mutante se realizó la extracción de DNA genómico de la colonia transformante obtenida. Para ello, se inoculó una colonia aislada en 4 mL de YPD (Anexo II) y se incubó a 30°C en agitación toda la noche. Posteriormente, se colocó 1.5 mL del cultivo en un microtubo tipo Eppendorf, se centrifugó por 10 segundos a 18,407 g y se desechó el sobrenadante. Se añadió otro volumen de 1.5 mL de cultivo y se repitió la operación anterior. Se lavó dos veces el precipitado con 1 mL de agua estéril y

se adicionaron 200 µL de solución A (Anexo III), 200 µL de solución B y 300 µL de perlas de vidrio (diámetro: 425 µm-600 µm, Sigma) a cada tubo. La mezcla fue homogenizada en vórtex a velocidad máxima durante 4 minutos. Pasado este tiempo se adicionaron 200 µL de amortiguador TE (Anexo III), se agitó en vórtex a velocidad máxima por 1 minuto y se centrifugó a 18,407 g por 15 minutos. La fase acuosa se transfirió a un tubo con la adición de 1 mL de etanol absoluto y 10 µL de acetato de amonio 4M. Se mezcló por inversión e incubó por 20 minutos a -20°C. Posteriormente se centrifugó a 18,407 g por 15 minutos. El precipitado se lavó con etanol al 70% y se dejó secar por 5 minutos a TA. El precipitado seco se resuspendió en 30 µL de amortiguador TE (Anexo III), se adicionó RNAsa A (10 mg/mL) y se incubó 30 minutos a 37°C. El DNA se conservó a -20°C.

3.2.2 Primer PCR para la confirmación de la mutante *S. cerevisiae* *CKS1/cks1 ::KanMX*.

Para comprobar la obtención de la levadura mutante *S. cerevisiae* *CKS1/cks1 ::KanMX* se realizó un PCR en el cual se utilizó como templado el DNA genómico extraído de la posible mutante *CKS1/cks1 ::KanMX* (sección 3.2.1) y los oligonucleótidos *CKS1A.conf-Fo* y *CKS1D.conf-Re*. La reacción de PCR se realizó en las siguientes condiciones:

Tabla 4. - Mezcla para el primer PCR de confirmación de la mutante

Solución	Muestra	Control
Amortiguador para PCR 10X	1X*	1 X*
MgCl ₂ 50mM	2 mM*	2mM*
dNTPs (10mM)	0.3 µM*	0.3 µM*
Oligo <i>CKS1A.conf-Fo</i> 100 ng/µL	2 ng/µL*	2 ng/µL*
Oligo <i>CKS1D.conf-Fo</i> 100 ng/µL	2 ng/µL*	2 ng/µL*
DNA genómico de <i>S. cerevisiae</i> <i>CKS1/cks1 ::KanMX</i> 100 ng/µL	1 ng/µL*	-
Taq DNA polimerasa recombinante 5 U/µL	1U*	1U*

(* concentración final en la mezcla de reacción)

Tabla 5. Programa utilizado para el primer PCR de confirmación de la mutante.

Paso	Tiempo	Temperatura
1	10'	94 °C
2	5'	94 °C
3	30''	58 °C
4	3'	72 °C
5	30 ciclos (2-4)	-
6	10'	72 °C
7	1h	8°C
8	End	

Como confirmación de obtención de la levadura mutante se debería obtener en este PCR dos productos: uno de 2067 pb correspondiente a *KanMX* con secuencias flanqueantes al gen *CKS1* y otro de 977 pb correspondiente al alelo *CKS1* silvestre con las mismas secuencias flanqueantes al locus donde este se ubica.

3.2.3. Segundo PCR para la confirmación de la mutante *S. cerevisiae* *CKS1/cks1 ::KanMX*.

Como otra forma de comprobación de la obtención de la levadura mutante y de la ubicación correcta del módulo *KanMX* en el locus del gen *CKS1* de *S. cerevisiae* se realizó otro PCR. Para este se utilizó como templado el DNA genómico extraído de la posible mutante *CKS1/cks1 ::KanMX* (sección 3.2.1) y los oligonucleótidos *CKS1A.conf-Fo* y *Conf.pF6a-Re* (Anexo I). La reacción de PCR se realizó en las siguientes condiciones:

Tabla 6. Mezcla para el segundo PCR de confirmación de la mutante.

Solución	Muestra	Control
Amortiguador para PCR 10X	1X*	1X
MgCl ₂ 50 mM	2 mM*	2 mM*
dNTPs 10mM	0.3 mM*	0.3 mM*
Oligo <i>CKS1A.conf-Fo</i> 100 ng/μL	2 ng/μL	2 ng/μL
Oligo <i>Conf.pF6a-Re</i> 100 ng/μL	2 ng/μL	2 ng/μL
DNA genómico de la mutante <i>CKS1/cks1 ::KanMX</i> 100 ng/ μL	1 ng/μL*	-
Taq DNA polimerasa recombinante 5 U/μL	1 U*	1 U*

(* concentración final en la mezcla de reacción)

Tabla 7. Programa utilizado para el PCR de confirmación de la mutante.

Paso	Tiempo	Temperatura
1	10'	94 °C
2	10'	94 °C
3	30"	58 °C
4	2'	72 °C
5	30 ciclos (2-4)	-
6	10'	72 °C
7	1h	8°C
8	End	

Como confirmación de obtención de la levadura mutante y de inserción del módulo *KanMX* en el locus del gen *CKS1* se esperaría en este PCR amplificación del fragmento de 801pb correspondiente a una parte de la secuencia flanqueante del gen *CKS1* y un segmento del gen *KanMX*.

3.2.4 Mapeo de sitios de restricción para comprobación de la mutante *CKS1/cks1 ::KanMX*.

Como otro método de confirmación de la obtención de la mutante *S. cerevisiae CKS1/cks1 ::KanMX* se realizó un mapeo de sitios de restricción del producto del PCR descrito en la sección 3.2.2. Fueron seleccionadas las enzimas *HindIII* y *NcoI* (Anexo IV) que digieren sitios esperados en este fragmento. Las mezclas de reacción de digestión aparecen en la tabla 8.

Tabla 8. Mezcla de reacción para realizar un mapa de restricción del PCR de confirmación de la mutante.

Mezcla de reacción para digestión	<i>Hind</i> III (7.5 U/ μ L) Invitrogen	<i>Nco</i> I (5 U/ μ L) Invitrogen
Producto de PCR (Sección 3.1.3)	2 ng/ μ L	2 ng/ μ L
Amortiguador 10X (Invitrogen)	Amortiguador M 1X	Amortiguador K 1X
Enzima	7.5 U	5 U

Las reacciones de digestión se incubaron toda la noche a 37°C.

Se esperaría como producto de la reacción de digestión con la enzima *NcoI* tres fragmentos: Dos de ellos de 714 y 1353 pb resultantes de la digestión del producto de PCR que contiene el módulo *KanMX* y el tercer fragmento de 977pb

correspondiente al producto de PCR que contiene el gen *CKS1* que no tiene sitio de reconocimiento para *NcoI*.

Por otro lado, se esperarían como productos de la reacción de digestión con la enzima *HindIII* cinco fragmentos: Tres de ellos de 276, 808 y 983 pb resultantes de la digestión del fragmento que contiene el módulo *KanMX* y los otros dos de 302 y 675 pb resultantes de la digestión del producto de PCR que contiene el gen *CKS1*.

3.3. Evaluación de complementación de la mutante diploide *S. cerevisiae* *CKS1/cks1* ::*KanMX* con las CKs de *T. vaginalis*.

3.3.1 Transformación de la cepa mutante diploide *S. cerevisiae* BY4743 *CKS1/cks1*.

Para llevar a cabo el experimento de complementación primeramente fueron realizadas cuatro transformaciones de la cepa mutante diploide *S. cerevisiae* BY4743 *CKS1/cks1* ::*KanMX* con las construcciones que aparecen en la tabla 9, obtenidas por la M. en C. Nataly Morales (Morales, 2015).

Tabla 9. Plásmidos utilizados para la complementación de la mutante.

Plásmidos	Descripción
pYES2- <i>Tvcks1</i>	Plásmido pYES2 contiene el gen <i>Tvcks1</i> de <i>T. vaginalis</i>
pYES2- <i>Tvcks2</i>	Plásmido pYES2 que contiene el gen <i>Tvcks2</i> de <i>T. vaginalis</i>
pYES2- <i>CKS1</i>	Plásmido pYES2 que contiene el gen <i>CKS1</i> de <i>S. cerevisiae</i> (control positivo)
pYES2	Plásmido portador de: promotor del gen <i>Gal1</i> de levadura inducible por galactosa, gen <i>URA3</i> de prototofía para uracilo (control negativo)

El plásmido pYES2 del cual se partió para obtener las construcciones empleadas en este trabajo, tiene un peso molecular de 5.9 kb y fue diseñado para la expresión inducible de proteínas recombinantes en *S. cerevisiae*. Este vector presenta: el promotor del gen *GAL1* de levadura para un alto nivel de expresión inducible de proteínas por galactosa y represión por glucosa; un sitio múltiple de clonación versátil, un terminador transcripcional *CYC1* para la eficiente terminación del ARN mensajero y el gen *URA3* de prototofía para uracilo para la selección de transformantes de las cepas huésped de levaduras con genotipo *ura3* (Figura 12) (Invitrogen, 2008).



Figura 12. Esquema del vector pYES2 con sus componentes principales.

Para realizar la transformación de cada una de estas construcciones, primeramente se inoculó en 10 ml de YPD la cepa mutante *S. cerevisiae* BY4743 *CKS1/cks1 ::KanMX* y se incubó incubado este cultivo toda la noche. Posteriormente se centrifugó a 1,157 g por 5 minutos, se desechó el sobrenadante y se lavó 2 veces. El precipitado fue resuspendido en agua bidestilada estéril, se midió la D.O. a 600 nm y se inoculó a una D.O. final de 0.05 en 50 mL de YPD incubándose a 30°C en agitación hasta alcanzar una D.O. de 0.3. Se centrifugó a 1,157 g por 5 minutos, se lavó el precipitado 2 veces con agua estéril y posteriormente se centrifugó a 25,200 g por 10 segundos desechando el sobrenadante. Se añadió al precipitado 400 µL de agua, 50 µL de acetato de Litio y 50 µL de TE resuspendiendo suavemente. Se emplearon 50 µL de células por cada transformación. Se agregó 10 µL de DNA de esperma de salmón por cada transformación, se añadió 200 ng de cada una de las cuatro construcciones (pYES2-*Tvcks1*, pYES2-*Tvcks2*, pYES2-*CKS1* y pYES2) y 300 µL de PEG 40%. Mezclar ligeramente en vórtex.

De cada transformación con las construcciones pYES2-*Tvcks1*, pYES2-*Tvcks2*, pYES2-*CKS1* y pYES2 se seleccionaron cuatro colonias transformantes. La selección fue realizada en el medio mínimo MM1/Dextrosa suplementado con los aminoácidos Histidina y Leucina (Anexo II). La mutante es auxótrofa para Uracilo y solamente las colonias que incorporaran el plásmido pYES2 que tiene el gen que confiere prototrofia para Uracilo podrían crecer en este medio. Este fue el criterio de selección de transformantes utilizado.

3.3.2. Inducción de la esporulación de los transformantes URA+.

A partir de las clonas transformantes obtenidas en la sección anterior portadoras de las construcciones pYES2-*Tvcks1*, pYES2-*Tvcks2*, pYES2-*CKS1* y pYES2 se indujo la esporulación. Para ello, fueron cultivadas en medio de pre-esporulación (Anexo II) y las cajas se incubaron a 30°C por 5 días. Pasado este tiempo, las colonias fueron cultivadas en medio de esporulación (Anexo II) y se incubaron por una semana a 30°C. En este punto, las células se analizaron al microscopio para observar el nivel de esporulación.

3.3.3. Ensayo de disección de tétradas.

Dos fracciones de gel de agarosa fueron cortadas de forma rectangular y depositados en cajas con medio YPGal/Raf (Anexo II). Se tomaron muestras con el asa de la colonia más esporulada de *S. cerevisiae* *CKS1/cks1* ::*KanMX* transformada con pYES2-*CKS1*, se resuspendieron en 10 µL de agua bidestilada estéril y fueron añadidos 20 µL de liticasa (Anexo IV). Se comprobó por microscopía la digestión de las ascas de las mutantes esporuladas. Se estrió una muestra del cultivo digerido en la parte superior del gel de agarosa y se separaron las esporas depositándolas de forma vertical empleando un micromanipulador Leitz-Wetzlar.

La Rafinosa (Raf) no reprime ni induce la transcripción del promotor *GAL1* del plásmido pYES2 y las construcciones derivadas de este, es adicionada en este caso al medio YPGal ya que se ha demostrado experimentalmente que la inducción del promotor *GAL1* por Galactosa es más rápida en células mantenidas en fuentes pobres de carbono como la Rafinosa o el Glicerol (Stockwell et al., 2015).

3.3.4. Ensayo de esporas al azar.

Se tomó una muestra de la colonia transformante más esporulada, se resuspendió en 20 µL de agua bidestilada estéril y se le añadió 30 µL de la enzima liticasa (Anexo IV). Se incubó 15 minutos a 30°C y posteriormente se observó al microscopio para confirmar la digestión de las ascas. Se añadió un volumen de agua bidestilada estéril en dependencia de la concentración de células, se plateó 100 µL en YPGal/Raf (Anexo II) y se incubó a 30°C.

Pasadas 24h se observaron colonias aisladas y se tomaron 100 colonias que fueron replicadas en YPGal/Raf con y sin Geneticina (200 µg/mL).

3.3.4.1 Selección por auxotrofías.

Las 100 colonias crecidas en YPGal/Raf (Anexo II) como se indica en la sección 3.3.4 se replicaron en cuatro cajas con el medio MM2/Gal/Raf (Anexo II) con Geneticina (200 µg/mL) y con diferentes combinaciones de aminoácidos (Histidina-Leucina, Histidina-Leucina-Lisina, Histidina-Leucina-Metionina, Histidina-Leucina-Lisina-Metionina) (ver concentraciones de aminoácidos en Anexo II). Las cajas se incubaron a 30°C por 3 días.

3.3.5 PCR de comprobación de los genotipos identificados a través de la selección por auxotrofías.

Para comprobar los genotipos deducidos por el método de selección por auxotrofías, se realizó la reacción de PCR descrita en la sección 3.2.2 empleando como templado el DNA genómico de las colonias seleccionadas en la sección 3.3.4.1.

3.3.6 Curva de crecimiento de clonas haploides mutantes CKS1⁻ de *S. cerevisiae* con las construcciones pYES2-CKS1, pYES2-Tvcks1 y pYES2-Tvcks2.

Para evaluar la capacidad de complementación de las CKSs de *T. vaginalis* comparadas con la CKS de *S. cerevisiae* se realizó una curva de crecimiento. Para ello, se inocularon colonias haploides mutantes con las construcciones pYES2-CKS1, pYES2-Tvcks1 y pYES2-Tvcks2 por separado en 5 mL de medio mínimo MM1/Gal/Raf con Histidina, Leucina y Lisina (Anexo II). Se incubaron a 30°C en agitación por tres días y pasado ese tiempo se centrifugaron a 2,057 g por 10 minutos a TA. Se lavó el precipitado con 5 mL de agua bidestilada estéril y se repitió la centrifugación anterior. Se resuspendió el precipitado en 2 mL de agua bidestilada estéril y se inició un cultivo a una DO₆₀₀ de 0.03 en 50 mL de MM1/Gal/Raf con Histidina, Leucina y Lisina. Transcurridas 8 h, se tomaron muestras de 1 mL para medir la DO₆₀₀ por espectrofotometría en intervalos de 1 hora. Se realizaron 13 mediciones hasta que los cultivos alcanzaron aproximadamente una DO₆₀₀ de 2. El tiempo de duplicación (Td) se calculó con la fórmula:

$$Td = \frac{\text{Log } 2}{m}$$

Donde m se refiere a la pendiente del gráfico de Log D.O. vs t, ajustada por mínimos cuadrados.

Para la velocidad específica de crecimiento (μ) se utilizó la fórmula:

$$\mu = \frac{1}{Td}$$

Los parámetros totales de crecimiento se calcularon hallando el promedio de estos entre las tres réplicas biológicas de la mutante *CKS1/cks1* ::*KanMX* con pYES2-*Tvcks1*, *CKS1/cks1* ::*KanMX* con pYES2-*Tvcks2* y el control positivo *CKS1/cks1* :: *KanMX* con pYES2-*CKS1*.

3.4. Evaluación de la formación de homodímeros de TvCKS1 y TvCKS2

3.4.1 Transformación de Escherichia coli M15 con las construcciones pQE30- *Tvcks1* y pQE30-*Tvcks2*.

Para expresar las proteínas TvCKS1 y TvCKS2 fusionadas a una etiqueta de 6 Histidinas en el extremo N-terminal, se emplearon los plásmidos pQE30-*Tvcks1* y pQE30-*Tvcks2* respectivamente (Morales, 2015). El plásmido pQE30 del cual se derivan estas construcciones contiene un gen de resistencia a ampicilina. Como cepa de expresión se utilizó *E. coli* M15 que porta el plásmido pREP4 el cual contiene un gen de resistencia a kanamicina. Por esta razón los transformantes fueron seleccionados al final en presencia de kanamicina y ampicilina.

Para obtener células competentes, 4 mL de LB (Anexo II) con kanamicina (50 $\mu\text{g/mL}$) fueron inoculados con *E. coli* M15 e incubados a 37°C por toda la noche con agitación. Posteriormente se inoculó un volumen 1/100 de este cultivo en 30 mL de LB con kanamicina y se incubó a 37°C en agitación hasta que alcanzara una DO_{550} de 0.5. A continuación, se llevó a cabo el protocolo modificado de Russell y Sambrook, 2001 de preparación y transformación de células competentes de *E. coli* usando cloruro de calcio.

3.4.2. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes TvCKS1 y TvCKS2 fusionadas a la etiqueta de Histidina.

Con el propósito de expresar y purificar las proteínas recombinantes His-TvCKS1 y His-TvCKS2, dos colonias transformantes: una de *E. coli* M15 pQE30-*Tvcks1* y otra de *E. coli* M15 pQE30-*Tvcks2* fueron inoculadas individualmente en 5 mL de LB con ampicilina (100 µg/mL) y kanamicina (50 µg/mL) por 16 horas a 37°C. Posteriormente, se inoculó con estos cultivos por separado 50 mL de LB con ampicilina y kanamicina incubándose en agitación a 37°C hasta que alcanzaron una DO₆₀₀ de 0.6. En este punto, se indujo la expresión de proteínas con IPTG a una concentración final de 1mM, por cuatro horas. Se tomaron muestras del cultivo antes y después de la inducción y se analizaron en un gel de acrilamida al 15 % en condiciones desnaturalizantes.

Para la purificación de las proteínas recombinantes His-TvCKS1 y His-TvCKS2, 5 mL de LB con ampicilina y kanamicina se inocularon con *E. coli* M15 pQE30-*Tvcks1* y de *E. coli* M15 pQE30-*Tvcks2* y se incubaron a 37°C toda la noche. Posteriormente, se inocularon individualmente estos cultivos en 95 mL de LB con ampicilina y kanamicina incubándose en agitación a 37°C hasta que alcanzara una DO₆₀₀ de 0.6. Se tomó una muestra y al resto se le añadió el IPTG incubándose en agitación a 37°C por 4h. A continuación, se centrifugó a 4000 g por 20 minutos a 4°C y se almacenó el precipitado a -20°C.

En el momento de la purificación, los precipitados de células se descongelaron durante 15 minutos en hielo y se resuspendieron en 4 mL de amortiguador de lisis (ver Anexo III). Se adicionaron 40 µL de lisozima (Anexo IV) y 0.4 µL de Nucleasa Benzonasa (Anexo IV) y se incubó en hielo por 30 minutos, mezclando suavemente la suspensión celular. Pasado este tiempo, se centrifugó a 25,200 g durante 30 minutos a 4°C. Se tomó una alícuota del sobrenadante para analizar por SDS-PAGE. Posteriormente, se añadió 400 µL de la resina de Agarosa acoplada a Níquel (Ni-NTA Agarose, Qiagen) a dos tubos de 1.5 mL para cada purificación y se centrifugó a 5000 g durante 2 minutos. Se lavó la resina con 400 µL de amortiguador de lisis. Se repitió la operación de centrifugación y se añadió nuevamente 400 µL de amortiguador de lisis a la resina concentrada. La resina resuspendida se mezcló con la fracción soluble del lisado incubándose 30 minutos a TA en agitación lenta.

Transcurrido este tiempo, la mezcla se transfirió a una columna y se dejó fluir. Se lavó tres veces con amortiguador de lavado (Anexo III) y se eluyó con tres alícuotas de 400 μ L de amortiguador de elución (Anexo III). Las fracciones correspondientes a la proteína no unida, a los lavados y las eluciones fueron recuperadas para ser analizada por SDS-PAGE y Western-blot. Las eluciones se dividieron en alícuotas de 100 μ L y fueron almacenadas a -20°C .

3.4.3. SDS-PAGE y Western blot para reconocer etiquetas de histidinas.

Las fracciones de cada paso de purificación de las proteínas recombinantes fueron analizadas en un gel de poliacrilamida al 15% (Anexo III) y se empleó un amortiguador de corrida con 0.05 % de SDS (Anexo III). Se añadió a las muestras el amortiguador de muestra 5X (Anexo III), se calentaron a 90°C por 5 minutos y se aplicaron en los pozos del gel. Para evaluar la formación de dímeros se empleó un amortiguador de muestra sin β -mercaptoetanol (Anexo III). La electroforesis se realizó a 20 mA por gel durante 1h.

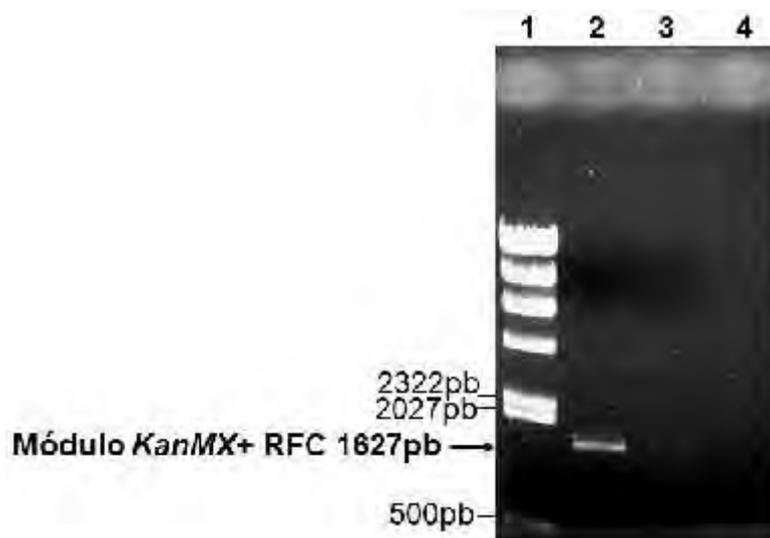
Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa durante 1 hora con 15 minutos a 350 mA, utilizando el amortiguador de transferencia (Anexo III). Las membranas se bloquearon durante 1h con leche descremada al 5% diluida en TTBS (Anexo III). Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con TTBS. Las membranas se incubaron con la sonda HisProbe-HRP (Thermo Scientific) durante una hora y nuevamente se realizaron 3 lavados de 10 minutos. Finalmente se reveló por quimioluminiscencia con el kit SuperSignalWest Pico (Bio-Rad) y se expusieron las membranas en placas fotográficas por distintos tiempos.

4. Resultados.

4.1. Construcción de la mutante *S. cerevisiae* *CKS1/cks1* ::*KanMX*.

4.1.1. Amplificación por PCR del módulo *KanMX*.

Con el objetivo de generar la mutante *S. cerevisiae* *CKS1/cks1* Δ ::*KanMX*, se amplificó por PCR el módulo *KanMX* fusionado a secuencias de 42 nucleótidos río arriba y río abajo que corresponden a las regiones que flanquean al gen *CKS1*, usando como templado el plásmido pFA6KANMX4 (Wach et al., 1994) (sección 3.1.1). Como resultado de este PCR, se obtuvo un producto de un tamaño aproximado al esperado de 1627 pb (Figura 13, carril 2).



4.1.2. Reemplazo de uno de los dos alelos de *CKS1* de *S. cerevisiae* BY4743.

Para generar la mutante diploide *CKS1/cks1* Δ ::*KanMX* se reemplazó por recombinación homóloga uno de los alelos del gen *CKS1* por el módulo de resistencia a Geneticina *KanMX*. Con este propósito se transformó la levadura silvestre *S. cerevisiae* BY4743 (diploide) con el fragmento compuesto por el

módulo *KanMX* unido a las regiones flanqueantes al gen *CKS1* generado anteriormente (sección 3.1.2) (Figura 14).

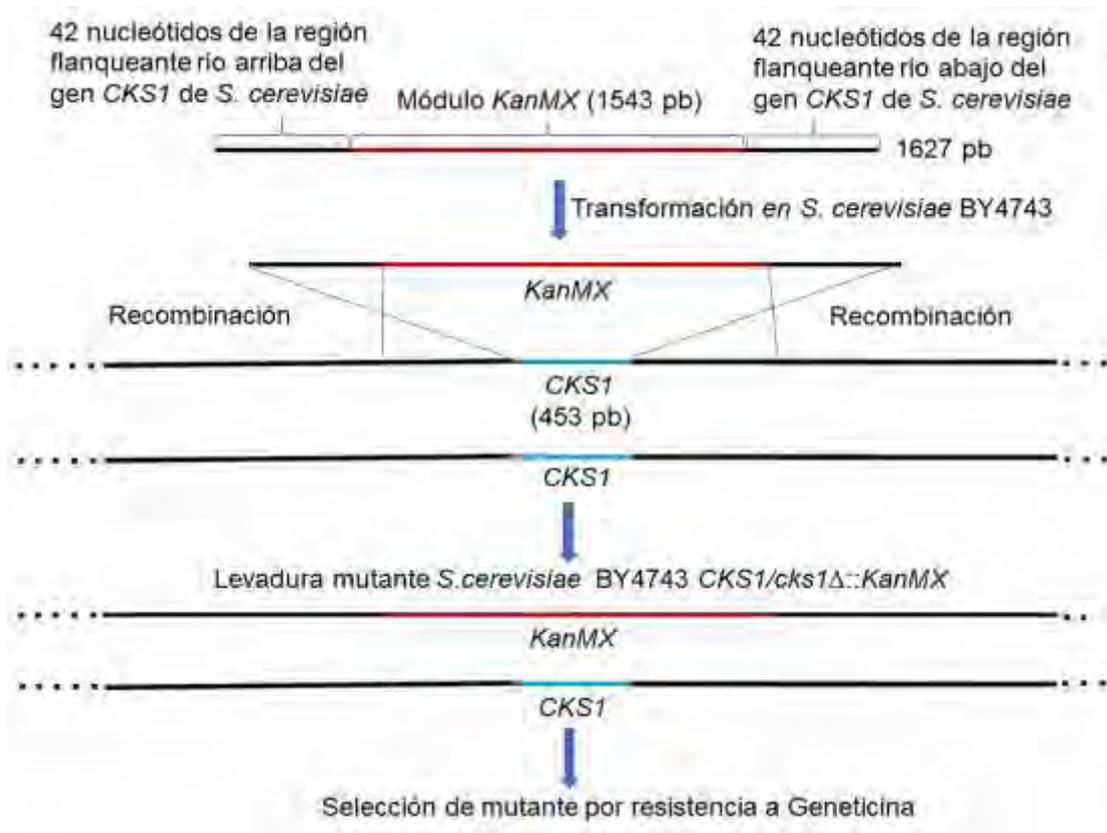


Figura 14. Estrategia general para obtención de la mutante de la levadura *S. cerevisiae* BY4743.

Dado que el gen *CKS1* es esencial para la levadura y el módulo *KanMX* confiere resistencia a Geneticina, en el medio de selección únicamente sobrevivirán aquellas células con uno solo de los dos alelos *CKS1* reemplazado por *KanMX*. Como resultado de esta metodología, se obtuvo una sola colonia transformante que se sometió a un pase de purificación, del que se seleccionaron 2 colonias aisladas. A estas dos colonias se les realizaron dos pruebas de confirmación para verificar que contuvieran la mutación deseada.

4.2. Confirmación de la mutante *S. cerevisiae* *CKS1/cks1 ::KanMX*.

4.2.1. Primera estrategia de confirmación.

La primera estrategia de confirmación consistió en realizar un PCR como se describe en la sección 3.2.2, donde se emplearon oligonucleótidos que hibridan en las regiones flanqueantes al locus del gen *CKS1* (Figura 15A). Si hay reemplazo de uno de los alelos de *CKS1* por *KanMX* se esperaría la amplificación de un fragmento de 2067 pb correspondiente a *KanMX* con secuencias flanqueantes al gen *CKS1*. Este fragmento se denominó KANMXf (Figura 14A) Además, se debe esperar otro producto de PCR de 977 pb que correspondería al alelo *CKS1* silvestre con las mismas secuencias flanqueantes al locus donde este se ubica. Este fragmento amplificado se denominó CKS1f (Figura 15B).

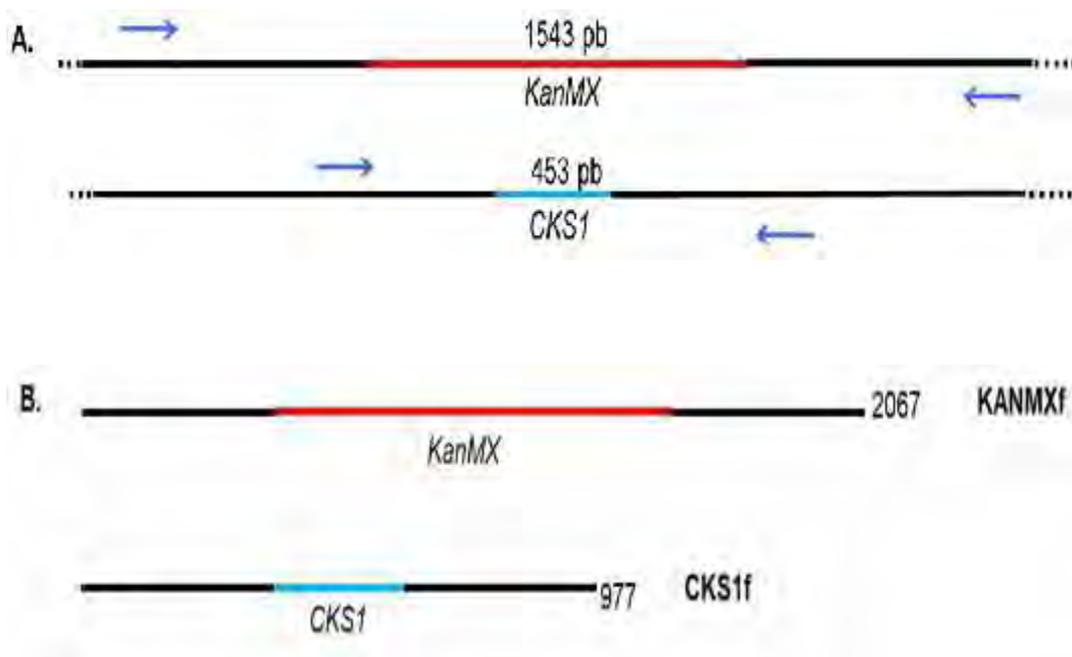


Figura 15. Esquema del primer PCR para la confirmación de la mutante diploide *S. cerevisiae* *CKS1/cks1 ::KanMX*. A. Sitios de hibridación de los oligonucleótidos respecto a un alelo del gen *CKS1* o al gen *KanMX* insertado en el locus del otro alelo de *CKS1* en la mutante. B. Productos de PCR: KANMXf: fragmento que corresponde al gen *KanMX*(rojo) con secuencias flanqueantes al locus del gen *CKS1*(negro) y CKS1f: fragmento correspondiente al alelo silvestre *CKS1* y secuencias flanqueantes del locus de este.

Como resultado de la amplificación, se obtuvieron dos productos: el primero (CKS1f) con un tamaño similar al esperado para el producto que contiene el

alelo silvestre *CKS1* (977 pb) y el segundo de aproximadamente 2067 pb (KANMXf) que es el tamaño esperado para el fragmento que contiene el gen *KanMX* y demuestra que hubo inserción de este en el locus del otro alelo de *CKS1* (Figura 16, carriles 2 y 3). Fueron analizadas mediante esta reacción de PCR dos clonas provenientes de la transformante inicial (Figura 16, carriles 2 y 3). Mediante esta prueba, se confirmó la obtención de la mutante *S. cerevisiae* *CKS1/cks1 ::KanMX*.

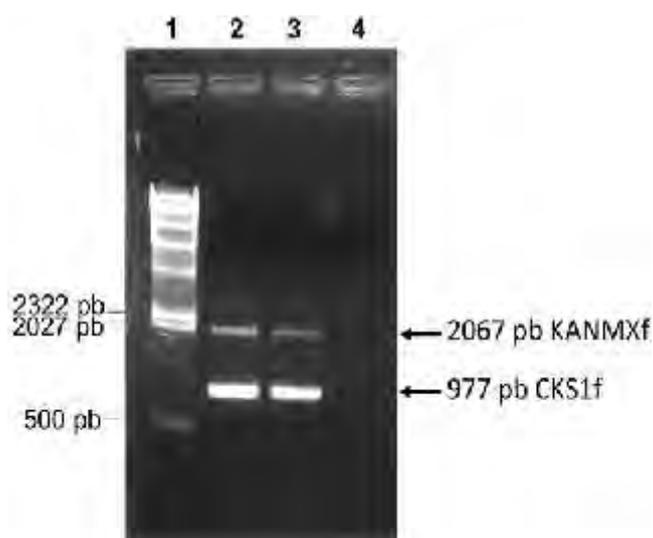


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR para confirmación de la mutante *S. cerevisiae* *CKS1/cks1 ::KanMX*. Carril 1: marcador de peso molecular, *HindIII*. Carril 2: Producto de PCR de confirmación clona 1. Carril 3: Producto de PCR de confirmación clona 2. Carril 4: control negativo. KANMXf: *KanMX* con segmentos flanqueantes al locus del gen *CKS1* CKS1f: alelo silvestre de *CKS1* con segmentos flanqueantes al locus del mismo.

4.2.2. Segunda estrategia de confirmación.

La segunda estrategia de confirmación consistió en realizar un PCR como se describe en la sección 3.2.3, empleando como cebadores un oligonucleótido sentido (el mismo empleado en el PCR de la sección 3.2.2) que hibrida con una secuencia río arriba respecto al locus del gen *CKS1* y un oligonucleótido antisentido que hibrida con una secuencia interna del gen *KanMX* (Figura 17A). Si hubiese inserción de *KanMX* en uno de los locus de *CKS1* se espera la amplificación del fragmento de 801pb correspondiente a una parte de la secuencia flanqueante del gen *CKS1* y un segmento del gen *KanMX*. Este fragmento amplificado se denominó KANMXf2 (Figura 17B).

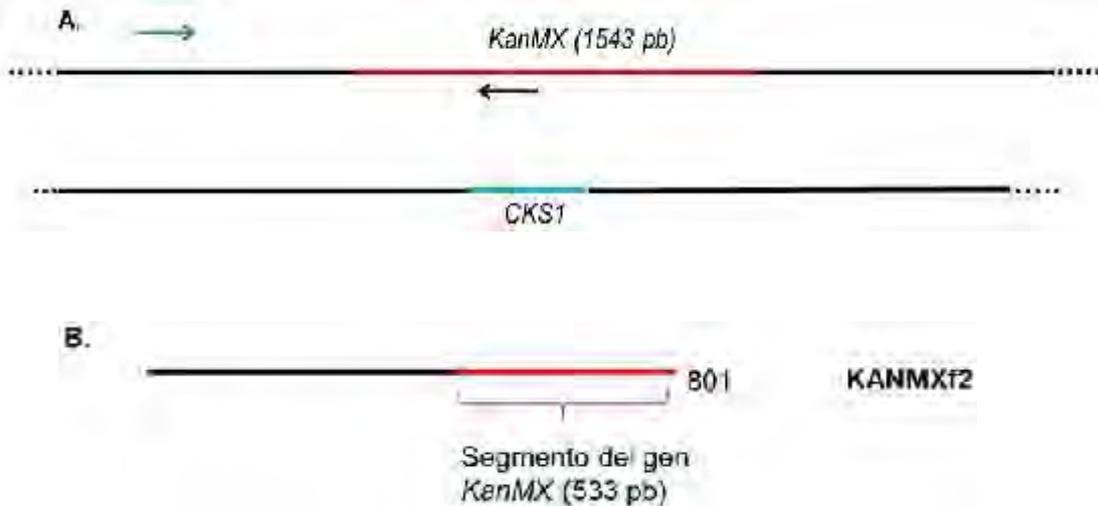


Figura 17. Esquema del segundo PCR para la confirmación de la mutante diploide *S. cerevisiae* *CKS1/cks1* ::*KanMX*. **A.** Sitios de hibridación de los oligonucleótidos en el cromosoma que contiene el módulo *KanMX* insertado en el locus del gen *CKS1* en la mutante. **B.** Producto de PCR: *KANMXf2*-Fragmento que corresponde a una parte del gen *KanMX*(rojo) con una fracción de secuencia situada *upstream* al locus del gen *CKS1*(negro).

Como resultado de este PCR se obtuvo un producto de aproximadamente 801 pb que coincide con el tamaño de fragmento esperado (Figura 18, carriles 2 y 3). Este resultado evidenció que el módulo *KanMX* fue insertado correctamente en el locus de *CKS1*.

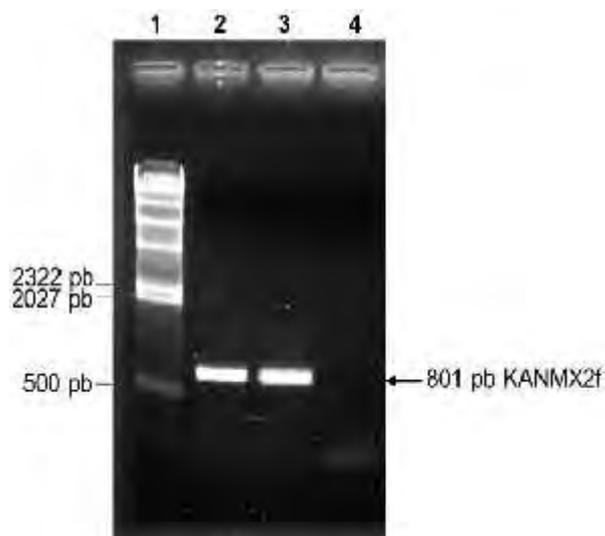


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR obtenidos mediante la segunda estrategia de confirmación de la mutante. Carril

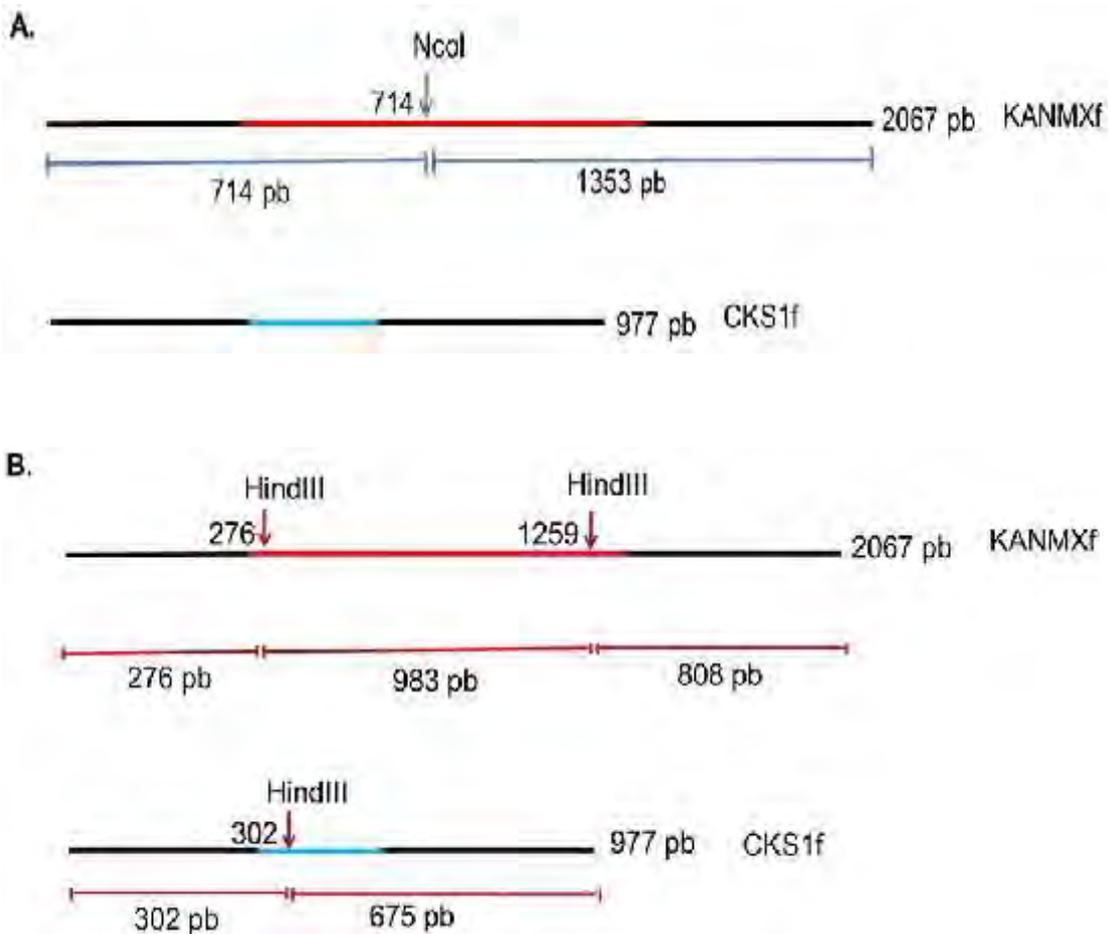
1: marcador de peso molecular (/*HindIII*). Carril 2: producto de PCR de confirmación clona 1. Carril 3: producto de PCR de confirmación clona 2.

4.2.3. Análisis de restricción de los productos de PCR de confirmación.

Para corroborar el resultado obtenido en la sección 4.2.1, se realizó un análisis de restricción en el que los productos de PCR fueron digeridos con las enzimas *NcoI* y *HindIII* (sección 3.2.4). La enzima *NcoI* solamente tiene un sitio de reconocimiento en el fragmento que contiene al módulo *KanMX* (KANMXf) generándose dos fragmentos de 714 y 1353 pb y se mantiene intacto el producto de 977pb que contiene el gen *CKS1* (CKS1f) (Figura 19A). Por otro lado, la enzima *HindIII* tiene dos sitios de reconocimiento en KANMXf y un sitio en CKS1f, dando lugar a cinco fragmentos de 276, 302, 675, 808 y 983 pb (Figura 19B).

En la Figura 19C (carriles 2 y 4), aparecen los productos de la digestión con las enzimas *NcoI* y *HindIII*, respectivamente. A partir de la digestión con *NcoI* se obtuvieron tres fragmentos del tamaño esperado, haciéndose evidente que la enzima digirió únicamente al fragmento más grande (KANMXf) corroborando que contiene el módulo *KanMX*. En el caso de la digestión con *HindIII* (Figura 19C, carril 4) se observan cuatro fragmentos y no cinco de acuerdo con la estimación teórica. La migración de los tres fragmentos de mayor tamaño coincide con los esperados de 675, 808 y 983 pb. En cuanto al fragmento de

menor tamaño, es posible que corresponda a la migración simultánea de los dos fragmentos de 276 y 302 pb y que no se hayan podido resolver en el gel de agarosa a la concentración utilizada. Como referencia se muestra el producto de PCR (carril 3), obtenido a partir del DNA genómico de la clona 1 (sección 4.2.1). De esta manera queda demostrado empleando diferentes pruebas que fue generada la mutante de *S. cerevisiae* *CKS1/cks1 ::KanMX*.



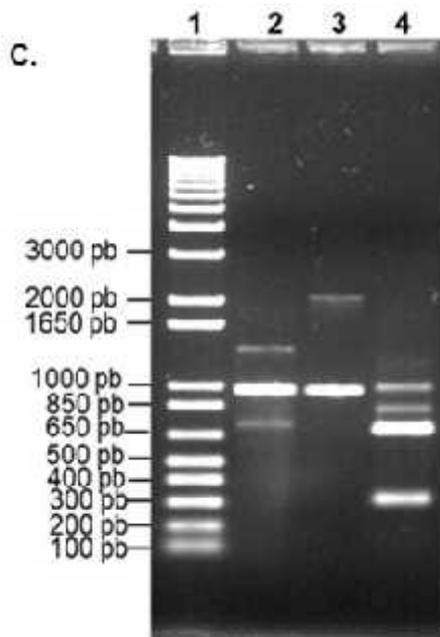


Figura 19. Análisis de restricción de los productos del primer PCR de confirmación de la mutante. En A. y B. KANMXf y CKS1f son los productos del primer PCR de confirmación de la mutante. KANMXf: Fragmento que corresponde al gen *KanMX* (rojo) con secuencias flanqueantes al locus del gen *CKS1* (negro) y *CKS1f*: Fragmento correspondiente al otro alelo silvestre *CKS1* y secuencias flanqueantes del locus de este. A) Esquema del sitio de corte y fragmentos resultantes al digerir con *NcoI*. B) Esquema de los sitios de corte y fragmentos resultantes al digerir con *HindIII* el producto de PCR. C) Electroforesis en gel de agarosa 1% de las reacciones de digestión con *NcoI* y *HindIII*. Carril 1: 1 kb Plus Ladder (Invitrogen). Carril 2: Productos del PCR digeridos con *NcoI*. Carril 3: PCR de confirmación de la mutante. Carril 4: Productos del PCR digeridos con *HindIII*.

4.3. Ensayo de complementación de la mutante *CKS1/cks1* ::*KanMX*.

Para realizar el ensayo de complementación se llevó a cabo la transformación de los vectores que contienen el gen a evaluar y posteriormente la inducción de la esporulación. Las levaduras tanto en su fase haploide como diploide, en presencia de cantidades apropiadas de nutrientes crecen y entran en sucesivas divisiones mitóticas, donde la célula hija recibe la misma carga genética de la madre. En ausencia de nutrientes, distintas respuestas celulares desencadenan otros procesos de división celular. Así, en medios con ausencia completa de nitrógeno y en presencia de una fuente de carbono no fermentable (como acetato), las células diploides (2n) abandonan el ciclo de crecimiento mitótico y entran en meiosis. De esta manera, se originan 4 células hijas con la mitad de la carga genética de la madre (células haploides, 1n), durante la esporulación (Neiman, 2005). Las cuatro células haploides, producto de la meiosis, quedan contenidas dentro de un saco denominado asca.

A nivel de laboratorio, aprovechando estos cambios en la levadura es posible evaluar la viabilidad de cada célula haploide hija en los experimentos de complementación separando las 4 esporas del asca y comprobando su sobrevivencia en medios específicos.

La apertura de las ascas puede lograrse utilizando una enzima (por ejemplo, liticasa), para posteriormente recuperar de manera independiente cada uno de los cuatro productos haploides, mediante un microscopio y un micromanipulador (González y Valenzuela, 2001). Además, se puede realizar otro ensayo denominado esporas al azar donde posterior a la ruptura de las ascas son analizadas un conjunto de esporas seleccionadas al azar y clasificadas según el fenotipo observado en métodos como la selección por auxotrofías (Siddiqui, 1971; Khare et al., 2011).

4.3.1. Transformación de la mutante *S. cerevisiae* *CKS1/cks1* ::*KanMX* con las construcciones *pYES2-Tvcks1* y *pYES2-Tvcks2*.

Con el propósito de evaluar si las proteínas TvCKS1 y TvCKS2 complementan la función de la proteína Cks1 de *S. cerevisiae*, se transformó la mutante con el vector vacío *pYES2* (control negativo) y con las construcciones previamente obtenidas por la M. en C. Nataly Morales (Morales, 2015): *pYES2-Tvcks1*,

pYES2-*Tvcks2* y pYES2-*CKS1* (control positivo) (sección 3.3.1). El plásmido pYES2 del cual se derivan estas construcciones contiene el marcador de selección *URA3* que confiere prototrofia para uracilo. Como resultado, fueron obtenidas las transformantes URA+ de la mutante *S. cerevisiae* *CKS1/cks1 ::KanMX* con cada una de las construcciones a evaluar. Se seleccionaron cuatro clonas aisladas de cada transformación para llevar a cabo un pase de purificación y posteriormente inducir la esporulación de cada una.

4.3.2. Inducción de la esporulación de las mutantes transformadas.

Para llevar a cabo el experimento de complementación se indujo la esporulación a partir de cada una de las mutantes transformadas. Esto se realizó creciéndolas en un medio pobre en fuentes de carbono y nitrógeno (medio de esporulación) como está descrito en la sección 3.3.2. En las mutantes con las construcciones pYES2-*Tvcks2* y pYES2-*CKS1* (control positivo) se observó por microscopía mayor nivel de esporulación que en las transformadas con las construcciones pYES2-*Tvcks1* y pYES2 (control negativo). En cada caso se seleccionó la colonia más esporulada y se evaluó la complementación empleando dos métodos: disección de tétradas y esporas al azar.

4.3.3. Evaluación de la complementación por disección de tétradas.

Para evaluar la complementación de la proteína Cks1 silvestre de *S. cerevisiae* *CKS1/cks1 ::KanMX* con pYES2-*CKS1* se realizó el método de disección de tétradas como se describe en la sección 3.3.3 (Figura 20). Dado que la expresión de los marcos abiertos de lectura clonados en el vector pYES2 se induce bajo la regulación del promotor *GAL1* (levadura), la presencia de galactosa en el medio de cultivo es necesaria.

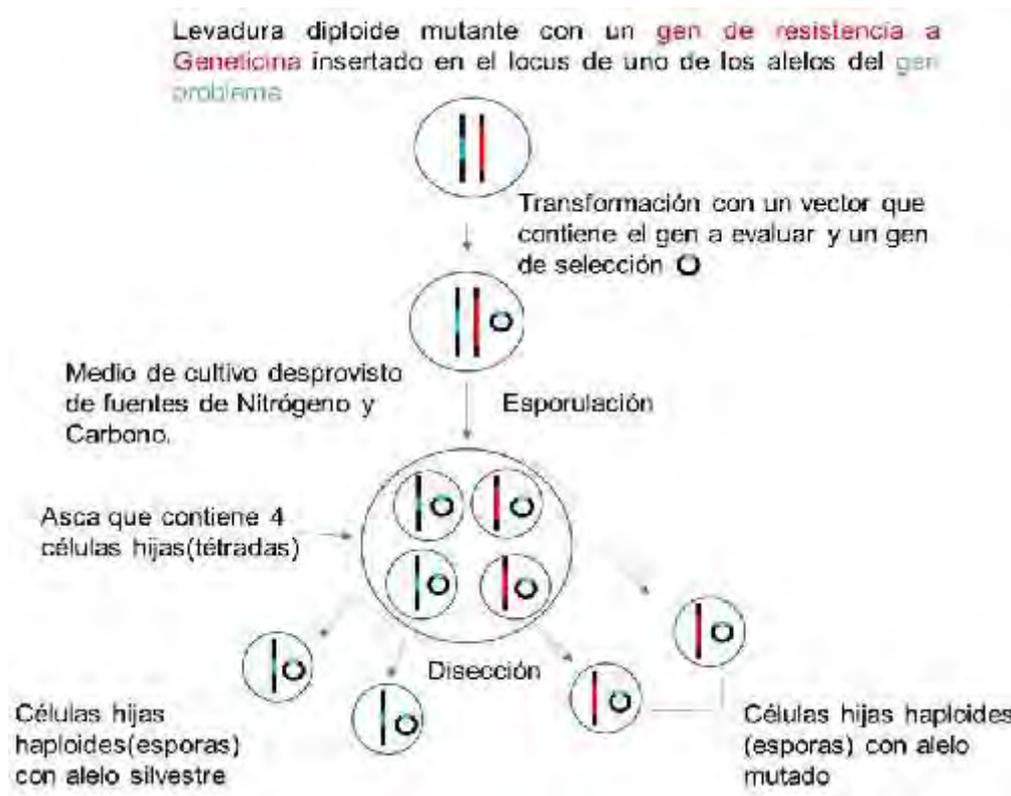


Figura 20. Estrategia para el experimento de complementación por disección de tétradas.

Como resultado se observó que del total de disecciones realizadas germinaron cuatro triadas (Figura 21A, flechas rojas) y tres tétradas (Figura 21, flechas negras). Posteriormente, todas las colonias germinadas fueron replicadas en una caja con YPGal/Raf y en otra de YPGal/Raf con Geneticina para poder comparar e identificar cuales tenían el fenotipo de resistencia a este antibiótico. El crecimiento de estas células haploides en un medio con Geneticina indica que son las hijas de la mutante diploide original que heredaron el gen *KanMX* insertado en el locus de uno de los alelos de *CKS1*. Estas haploides mutantes serían viables solo si la proteína Cks1 expresada a partir del plásmido pYES2-*CKS1* estuviera complementando la función en la mutante nula para este gen.

Pasadas 48 h de incubación de las esporas germinadas y replicadas en YPGal/Raf sin y con Geneticina, dos de las tres tétradas disectadas tuvieron el patrón esperado para un ensayo positivo de complementación (Figura 21B recuadros rojos 6 y 7). Se observó que dos de las cuatro esporas no pueden crecer en el medio de selección con Geneticina, lo que correspondería a las

células haploides con el alelo silvestre de *CKS1* que no tienen el gen *KanMX* en su genoma. Las otras dos colonias de la tétrada pudieron crecer en el medio con Geneticina, que es el fenotipo que corresponde a células haploides mutantes con el otro alelo de *CKS1* reemplazado por el gen *KanMX* que le confiere resistencia a dicho antibiótico. Estas colonias son viables además porque la proteína *CKS1* de *S. cerevisiae* (control positivo) está complementando la función del alelo silvestre que ha sido reemplazado.

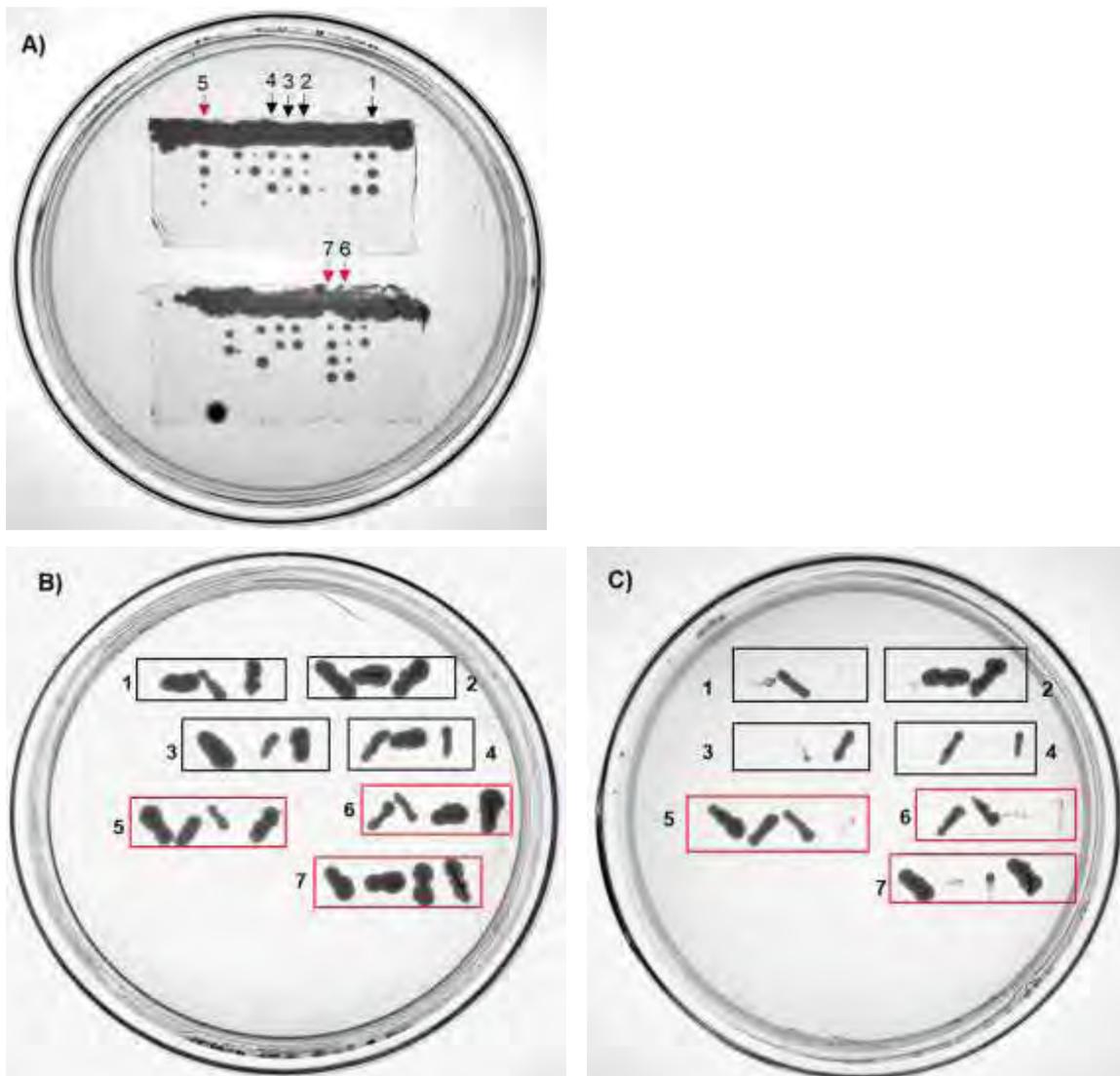


Figura 21. Ensayo de complementación de *S. cerevisiae* *CKS1/cks1* ::*KanMX* transformada con pYES2-*CKS1* (control positivo). A) Disección de tétradas. Triada de esporas disectadas (flechas negras). Tétradas disectadas (flechas rojas). B) y C) Crecimiento de las triadas 1-4 (recuadros en negro) y tétradas 5-7 (recuadros en rojo) seleccionadas en el ensayo de disección en medios B) YPGal/Raf C) YPGal/Raf con Geneticina.

Para confirmar el genotipo se tomó una de las tétradas con el fenotipo representativo de complementación (Figura 22A) y se realizó el PCR de confirmación descrito en la sección 3.2.2 en el cual se esperaría un producto de 977 pb denominado KANMXf (para el caso de sustitución del locus nativo por el gen *KanMX*), mientras que si se trata del locus nativo se obtendría un producto de 977pb. Con este propósito, primeramente, se extrajo DNA genómico de las células crecidas a partir de cada espora de la tétrada seleccionada el cual sirvió de molde, lográndose la amplificación del fragmento esperado para esporas transformadas con *KanMX*. Como resultado de los PCR realizados a partir del DNA genómico de dos colonias de la tétrada analizada (Figura 22A, carriles 1 y 4) se obtuvo un único fragmento de aproximadamente 2067 pb correspondiente a la sustitución del alelo silvestre por *KanMX* como se comentó-anteriormente (Figura 22B, carriles 1 y 4) comprobándose de esta manera que estas colonias provienen de células haploides mutantes que contienen el gen *KanMX* insertado en el locus de *CKS1*. En el caso de las dos colonias que no crecieron en YPGal/Raf con Geneticina, se obtuvo un producto de PCR de aproximadamente 977 pb correspondiente al fragmento que contiene el gen *CKS1* silvestre (*CKS1f*) (Figura 22B, carril 2 y 3). De esta manera se demostró que estas colonias provienen de células haploides de la tétrada disectada que portan el alelo silvestre. A través de estas reacciones de PCR se demostró a nivel genómico y en correspondencia con el fenotipo observado, que *Cks1* de *S. cerevisiae* regenera la viabilidad de las células haploides que carecen del gen *CKS1*. Este resultado coincide con lo esperado como control positivo e indica que el sistema elegido para demostrar complementación funciona.

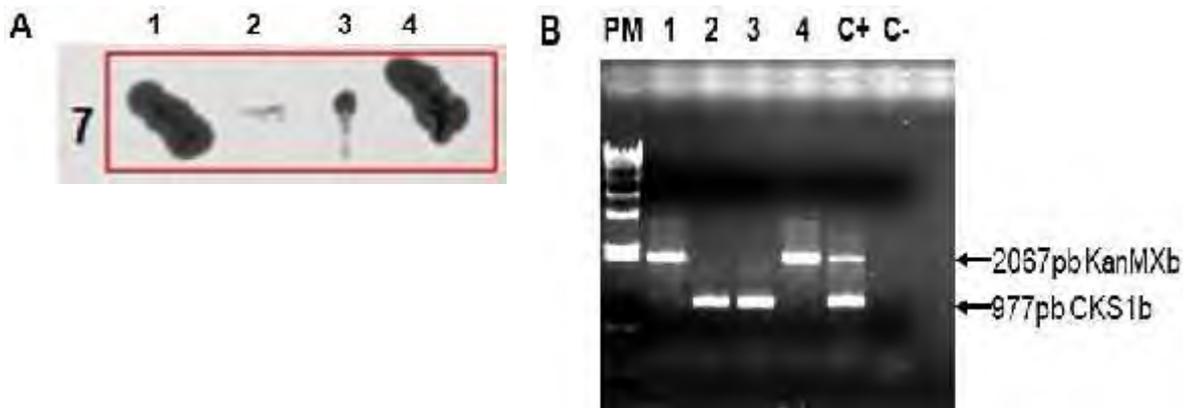


Figura 22. Comprobación de la complementación de *S. cerevisiae* *CKS1/cks1 ::KanMX* transformada con *pYES2-CKS1* (control positivo). Panel A. Tétrada con el número 7 en la Figura 19C, seleccionada para analizar el genotipo mediante PCR. **Panel B.** PCR de confirmación de la complementación de la mutante *S. cerevisiae* *CKS1/cks1 ::KanMX* transformada con *pYES2-CKS1*. PM: Peso Molecular (DNA de Fago /HindIII). **Para A. y B. Carril 1:** Colonia haploide mutante. **Carril 2:** Colonia haploide silvestre. **Carril 3:** Colonia haploide silvestre. **Carril 4:** Colonia haploide mutante. **Para B. C+:** Diploide mutante sin transformar (control positivo). **C-:** Control negativo de PCR.

4.3.4 Evaluación de la complementación por el método de esporas al azar.

Debido a problemas técnicos del micromanipulador no fue posible evaluar si TvCKS1 y TvCKS2 podían complementar la mutante *S. cerevisiae* *CKS1/cks1 ::KanMX* empleando el método de disección de tétratas. Por esta razón se realizó con este fin el método de esporas al azar (Figura 23) y posteriormente se llevó a cabo la identificación del genotipo mediante un tamizaje en diferentes medios de cultivo (Figura 24). Estos métodos se llevaron a cabo como aparece descrito en la sección 3.3.4. y 3.3.4.1. Para desarrollar este análisis se tomó en cuenta el genotipo de la levadura *S. cerevisiae* BY4743 (*MATa/ his3 1/his3 1 leu2 0/leu2 0 LYS2/lys2 0 met15 0/MET15 ura3 0/ura3 0*) y de acuerdo a este se tuvieron las siguientes consideraciones: 1) los cuatro medios a evaluar deben contener histidina y leucina ya que la levadura diploide parental es auxótrofa a ambos aminoácidos (*his3-/his3-*, *leu2-/leu2-*) y 2) el plásmido *pYES2* del cual se derivan las construcciones con las que se transformó la mutante contiene el marcador *URA3* que confiere prototofía a uracilo, por lo que no es necesario adicionarlo a ninguno de los medios a evaluar.

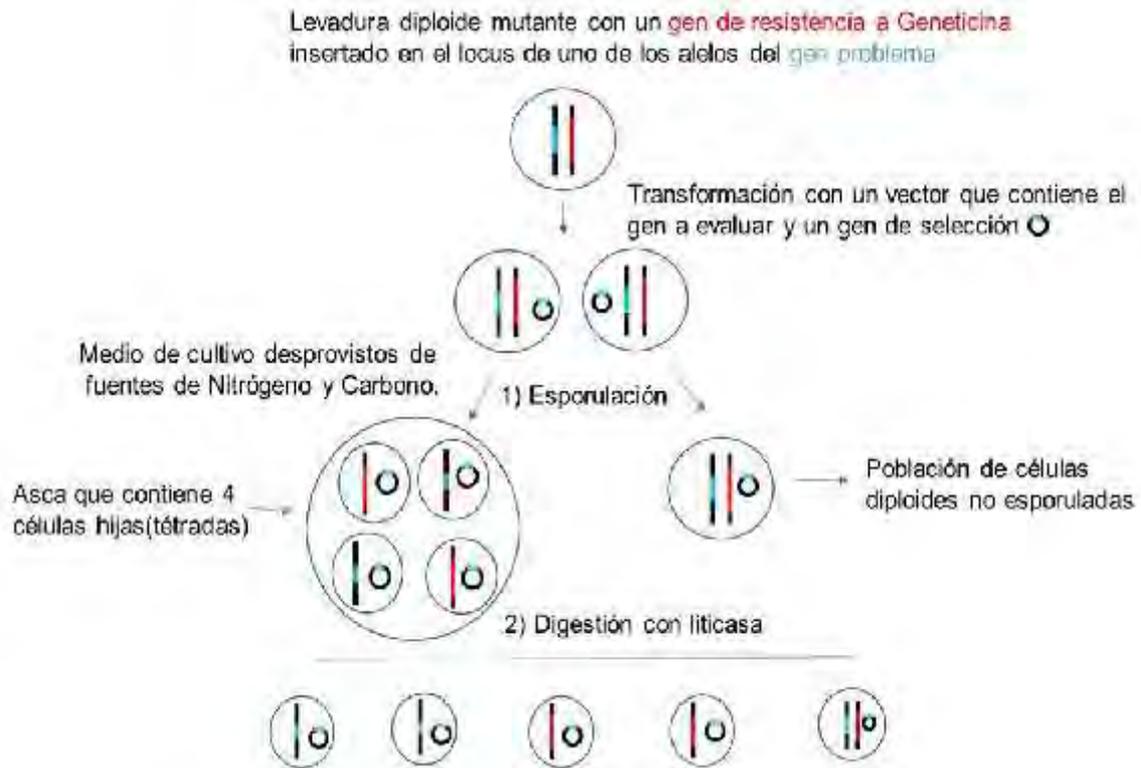


Figura 23. Estrategia para el experimento de complementación por esporas al azar.



Diploides – Pueden crecer en todos los medios evaluados.

Haploides con alelo mutado- Un conjunto de colonias con este genotipo puede crecer en unos medios con determinadas combinaciones de aminoácidos y en otros no (Como resultado del proceso de recombinación genética y segregación de los genes pueden heredar algunas auxotrofías y otras no).

Haploides con alelo silvestre-No pueden crecer en ninguno de los medios de cultivo evaluados porque no tienen el gen *KanMX*.

Figura 24. Esquema del método de selección por auxotrofías. Criterios para la clasificación a través de los diferentes fenotipos observados. MM2/Gal/Raf (Anexo II), His - Histidina, Leu - Leucina, Lys - Lisina, Met - Metionina, Gen - Geneticina.

El principio que se sigue en este método es que, durante el proceso de meiosis, producto de la recombinación genética y segregación de los genes al azar, las células hijas haploides pueden heredar algunas auxotrofías y otras no. Por lo tanto, estas células haploides crecerían únicamente en los medios suplementados con los aminoácidos que correspondan a las auxotrofías que han heredado. Además de cumplir con lo antes mencionado, para que sean viables las haploides mutantes tienen que tener el gen *KanMX* que le permita crecer en presencia de Geneticina y el plásmido que estas contienen con el gen a evaluar debe expresar un producto que complemente la función de la mutante deficiente en la proteína Cks1.

Como resultado de estos ensayos se observó que de 100 colonias evaluadas en el medio mínimo MM2Gal/Raf con Geneticina, 5 colonias hijas de la mutante con pYES2-*Tvcks1* y 19 colonias hijas de la mutante con pYES2-*Tvcks2* pudieron crecer solo en presencia de Lisina o Metionina en el medio de cultivo. Estas colonias fueron identificadas genóticamente como haploides mutantes según el método de selección por auxotrofías (Tabla 10 y 11) (Figura 2, Anexo V).

Por otra parte, se identificó otro grupo de 11 colonias en el caso de la mutante transformada con pYES2-*Tvcks1* y 15 colonias en el caso de la mutante con pYES2-*Tvcks2* que no pudieron crecer en ninguno de los 4 medios en presencia de Geneticina y crecieron en YPGal/Raf (Figura 1, Anexo V). Este grupo se clasificó con el fenotipo de haploides silvestres ya que carecen del gen *KanMX* en su genoma lo que les impide crecer en presencia de Geneticina (Figura 2, Anexo V) (Tablas 10 y 11).

En este ensayo se observó una esporulación considerablemente menor de la mutante transformada con pYES2-*Tvcks1* en comparación con la mutante transformada con pYES2-*Tvcks2*. Esto explica que la cantidad de colonias haploides sea más baja en la primera debido a que la baja esporulación, disminuye la probabilidad de seleccionar células haploides con relación a las diploides que no esporularon.

Adicionalmente, se identificó un tercer grupo mayoritario de colonias que crecen en los cuatro medios con diferentes combinaciones de aminoácidos que se y clasificaron genóticamente como diploides (Figura 2, Anexo V) (Tablas 10 y 11). El criterio para esta determinación se basó en que las

diploides parentales son auxótrofas para histidina, leucina y uracilo y esto es compensado por la presencia de histidina y leucina en todos los medios y por tener el plásmido pYES2 que aporta el gen de prototrofia *URA3*.

Es importante mencionar que hay una población, que posiblemente no se pudo identificar por este método: células haploides mutantes que heredaron los alelos dominantes *LYS2* y *MET15* que confieren prototrofia para Lisina y Metionina, respectivamente y que, por ende, son capaces de crecer en todos los medios de tal forma que se interprete erróneamente como células diploides.

Al analizar el control negativo (*S. cerevisiae* *CKS1/cks1 ::KanMX* con el vector vacío pYES2) a través de este tamizaje se identificaron 65 colonias que crecieron en todos los medios evaluados por lo que se clasificaron como células diploides. Se identificó además un segundo grupo de 35 colonias que no crecieron en ninguno de los medios evaluados pero que crecieron en YPGal/Raf (Figura 1 Anexo V), por lo que se clasificaron como haploides silvestres (Figura 2 Anexo V) (ver resumen en Tabla 12). El resultado obtenido para el control negativo concuerda con lo esperado debido a que la única población de células haploides que podrían sobrevivir, serían aquellas que tienen el alelo *CKS1* silvestre. En el caso de las esporas haploides mutantes, al no portar el gen esencial *CKS1*, no serían viables.

Tabla 10. Resultados del método de esporas al azar en las mutantes transformadas con pYES2-Tvcks1.

YPGal/ Raf	YPGal/ Raf + Gen	*His+Leu +Gen	*His+Leu +Lys +Gen	*His+Leu + Met +Gen	*His+Leu +Lys+Met +Gen	No. de colonias	Genotipos deducidos por selección por auxotrofías
+	+	-	+	-	+	5	Haploide mutante
+	-	-	-	-	-	11	Haploide silvestre
+	+	+	+	+	+	84	Diploide mutante

Tabla 11. Resultados del método de esporas al azar en las mutantes transformadas con pYES2-Tvcks2.

YPGal/ Raf	YPGal/ Raf + Gen	*His+Leu +Gen	*His+Leu +Lys +Gen	*His+Leu + Met +Gen	*His+Leu +Lys+Met +Gen	*No. de colonias	Genotipos deducidos por selección por auxotrofías
+	+	-	+	-	+	11	Haploide mutante
+	+	-	-	+	+	2	
+	+	-	-	-	+	6	
+	-	-	-	-	-	15	Haploide silvestre
+	+	+	+	+	+	66	Diploide mutante

Tabla 12. Resultados del método de esporas al azar en las mutantes transformadas con pYES2.

YPGal/ Raf	YPGal/ Raf + Gen	*His+Leu +Gen	*His+Leu+ Lys +Gen	*His+Leu+ Met +Gen	*His+Leu +Lys+Met +Gen	No. de colonias	Genotipos deducidos por selección por auxotrofías
+	-	-	-	-	-	35	Haploide silvestre
+	+	+	+	+	+	65	Diploide mutante

* Medio mínimo: MM2/Gal/Raf (Anexo II) suplementado con los aminoácidos requeridos.

His: Histidina, Leu: Leucina, Lys: Lisina, Met: Metionina y Gen: Geneticina (ver concentraciones en Anexo II).

4.3.5. PCR confirmatorio de la complementación por TvCKs1 y TvCKs2.

Para confirmar los genotipos deducidos por el método de selección por auxotrofia (secciones 4.3.4 y 4.3.5), se llevó a cabo la reacción de PCR descrita en la sección 3.2.2.

El PCR a partir de DNA genómico obtenido de las clonas clasificadas como células haploides mutantes (tanto las transformadas con pYES2-Tvcks1 como con pYES2-Tvcks2) dio como resultado la amplificación de un fragmento de aproximadamente 2067 pb (Figura 25A y 25B, carril 2), que corresponde al tamaño esperado para el fragmento que contiene el gen *KanMX* (KANMf) (sección 4.2.1, Figura 15). En ninguno de los dos casos se observó el amplicón de 977 pb correspondiente a CKS1f que contiene el alelo silvestre

CKS1. Este resultado sugiere que las clonas clasificadas como haploides mutantes, tienen el genotipo esperado: son viables en ausencia del alelo *CKS1* silvestre porque el producto de la expresión de los genes *Tvcks1* y *Tvcks2* está complementando la función de la *Cks1* de *S. cerevisiae*.

Los productos de los PCRs realizados a partir del DNA genómico de las colonias clasificadas como células haploides silvestres mostró (tanto las transformadas con pYES2-*Tvcks1* como con pYES2-*Tvcks2*) la amplificación de un fragmento de aproximadamente 977 pb, correspondiente al alelo silvestre *CKS1* (Figura 25A y 25B, carril 3), corroborándose así la clasificación realizada mediante la selección por auxotrofías.

Se analizó además el genotipo de una tercera población de células clasificadas como diploides. En éstas, se observaron los fragmentos KANMXf (2067 pb) que contiene el gen *KanMX* y *CKS1f* (977pb) que contiene el alelo silvestre *CKS1*(Figura 25 A y B, carril 4) lo cual se corresponde a la clasificación realizada a través del fenotipo observado en el método de selección por auxotrofías.

De igual manera se evaluaron las colonias resultantes del método de esporas al azar a partir de la mutante con el plásmido vacío pYES2 (control negativo del experimento). Se realizó el PCR a partir del DNA genómico de colonias representativas de los dos genotipos deducidos por el método de selección por auxotrofías: diploides y haploides silvestres. La evaluación por PCR de las colonias identificadas como haploides silvestres dio como resultado la amplificación de un producto de 977 pb (Figura 25C carriles 2 y 3). El producto

de PCR obtenido a partir de una colonia diploide, dio como resultado la amplificación de los dos fragmentos esperados de 2067 y 977 pb aproximadamente (Figura 25C, carril 4). Este resultado está en correspondencia con la identificación realizada por el método de selección por auxotrofías.

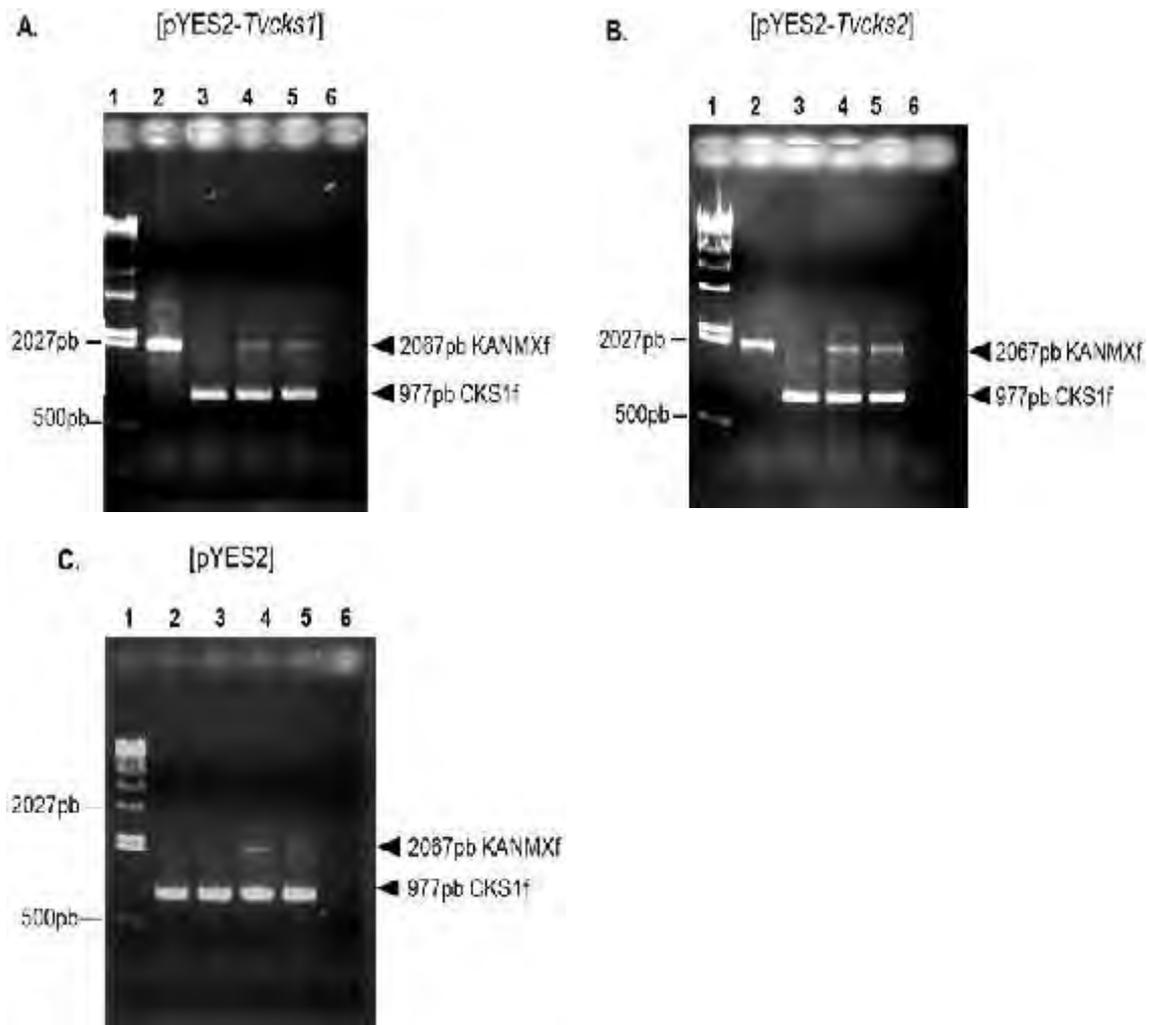


Figura 25. PCR de confirmación del ensayo de complementación. PCR a partir de DNA genómico de poblaciones de células clasificadas a través de selección por auxotrofías a partir de la mutante transformada con: A. pYES2-*Tvcks1*. B. pYES2-*Tvcks2* y C. pYES2. Para A. y B.: carril 1-Marcador de peso molecular DNA de Fago /HindIII, carril 2-Colonia haploide mutante, carril 3- Colonia haploide silvestre, carril 4- Colonia diploide carril 5- Diploide mutante sin transformar (control positivo) carril 6-Control negativo. Para C. Carril 1: Marcador de peso molecular DNA de Fago /HindIII carril 2-Colonia haploide mutante, carril 3-Colonia haploide silvestre, carril 4-Colonia diploide, carril 5- Diploide mutante sin transformar (control positivo), carril 6-Control negativo.

4.3.6. Curva de crecimiento de haploides mutantes con pYES2-*Tvcks1*, pYES2-*Tvcks2* y el control positivo pYES2-*CKS1*.

Para evaluar la capacidad de complementación de las CKSs de *T. vaginalis* comparadas con la CKS de *S. cerevisiae* se realizó una curva de crecimiento como está descrito en la sección 3.3.6. Se seleccionaron para el estudio 3 clonas haploides mutantes con las construcciones pYES2-*Tvcks1* (clonas

102.1, 102.2 y 102.3), pYES2-*Tvcks2* (clonas 16.1, 16.2 y 16.3) y pYES2-*CKS1* (clonas 21.1, 21.2 y 21.3) como control positivo. Las haploides mutantes evaluadas tienen iguales auxotrofías (*his3*, *leu2*, *lys2*, *MET15*, *ura3*) según el fenotipo observado en el método de selección por auxotrofías.

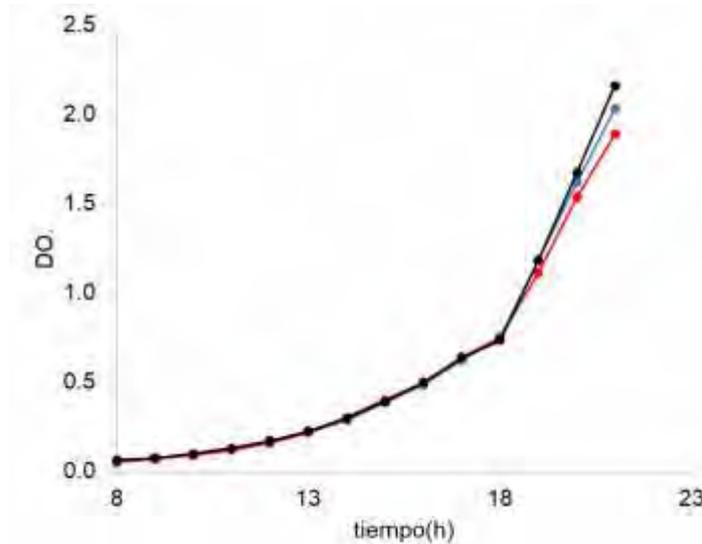


Figura 26. Curva promedio de crecimiento de las clonas haploides mutantes transformadas con: pYES2-*CKS1*, control positivo (negro); pYES2-*Tvcks1*(azul) y pYES2-*Tvcks2* (rojo).

Cómo se observa en la Figura 26, las curvas de crecimiento de las clonas haploides mutantes de *S. cerevisiae* transformadas con pYES2-*Tvcks1* (azul), pYES2-*Tvcks2* (rojo) y con pYES2-*CKS1*] (negro) como control positivo son muy similares. Los parámetros de crecimiento calculados a partir de estas curvas corroboran la semejanza entre ellas (Figura 27A y 27B). Este resultado sugiere que la capacidad de complementación es semejante entre *TvCKS1*, *TvCKS2* y la *CKS1* de *S. cerevisiae*.

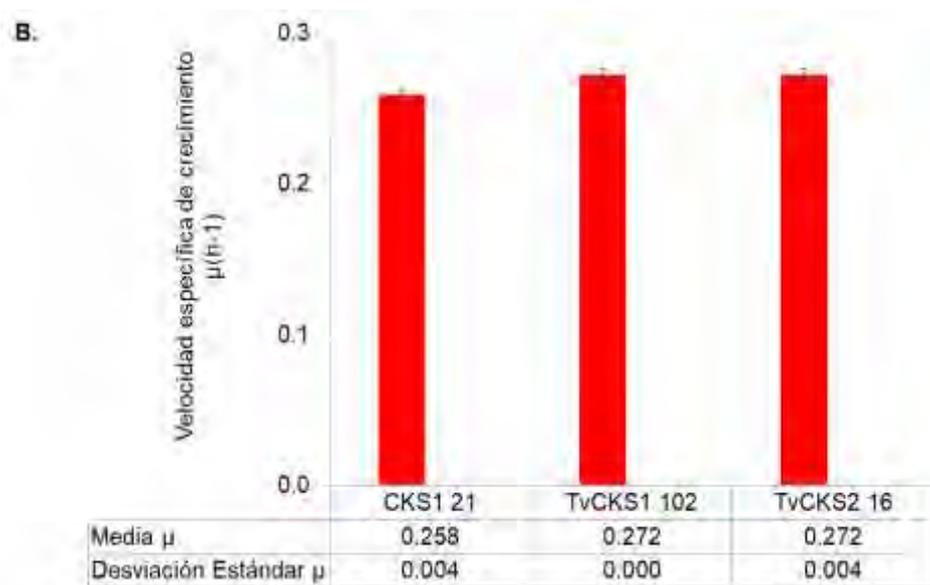
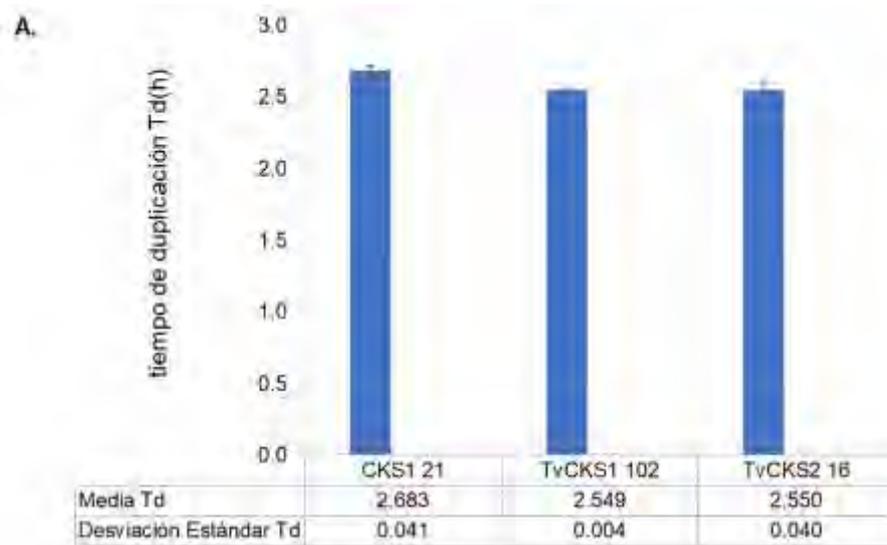


Figura 27. Parámetros de crecimiento evaluados en las clonas haploides mutantes con el plásmido pYES2-CKS1 control positivo (CKS1 21); pYES2-*Tvcks1* (TvCKS1 102) y pYES2-*Tvcks2* (TvCKS2 16) A. Valores promedio de tiempo de duplicación(Td); B. Valores promedio velocidad específica de crecimiento (μ). Aparecen señaladas las desviaciones estándar de las tres replicas que se hicieron en cada caso.

4.4- Dimerización de las TvCKS de *T. vaginalis*.

4.4.1. Expresión y purificación de las proteínas TvCKS1 y TvCKS2 recombinantes fusionadas a una etiqueta de Histidina.

Para determinar si TvCKS1 y TvCKS2 forman homodímeros, característica estructural común en la familia de CKSs de levaduras a humanos, primeramente, se indujo la expresión de estas proteínas de manera recombinante fusionadas a una etiqueta de histidinas. Fueron evaluadas colonias transformantes de *E. coli* M15 con las construcciones pQE30-*Tvcks1* y pQE30-*Tvcks2*. El plásmido pQE30, a partir de cual se derivan estas construcciones, contiene la etiqueta compuesta por 6 Histidinas situada en la región N-terminal del sitio múltiple de clonación. Además, para la selección de los transformantes, este vector tiene un gen de resistencia a ampicilina y la cepa *E. coli* M15 posee un plásmido denominado pREP4 que confiere resistencia a kanamicina. Por esta razón los transformantes fueron cultivados en LB en presencia de kanamicina y ampicilina (sección 3.4.1).

La expresión de las proteínas se indujo con IPTG y pasadas 4 horas (tiempo seleccionado previamente como el de máxima expresión) se procedió a hacer la purificación por un método de afinidad Histidina-Níquel empleando la resina de agarosa acoplada a Níquel (Ni-NTA Agarose, Qiagen) (sección 3.4.2). Los pasos de purificación fueron evaluados en un SDS-PAGE y un Western-blot (sección 3.4.3).

Por SDS-PAGE se evidenció la expresión de las proteínas recombinantes TvCKS1 (Figura 28, panel A, carril 3) y TvCKS2 (Figura 29, panel A, carril 2) respecto al control sin inducir (Figuras 28 y 29, panel A, carril 2 y 1, respectivamente). La banda de 12 kDa correspondiente al peso molecular de las proteínas TvCKS1 y TvCKS2 monoméricas se visualiza en la fracción soluble y en los pasos de purificación de cada proteína (Figuras 28 y 29, carriles 5-10). La expresión y purificación de las proteínas TvCKS1 y TvCKS2 recombinantes se corroboró por Western-blot empleando como método de detección una sonda anti-His Probe (Figura 28 y 29, panel B). En el Western-blot de la primera elución en la purificación de TvCKS1 (Figura 28, panel B, carril 8) además de la banda asociada al monómero de la proteína, se detecta otra de baja intensidad con un peso molecular aproximado de 24 kDa el cual

corresponde a un dímero de esta proteína según las estimaciones teóricas. Este resultado sugiere la existencia de interacciones fuertes entre la proteína TvCKs1 que soportan las condiciones desnaturalizantes. Un resultado semejante se obtuvo en anteriores estudios en *T. cruzi* y *L. mexicana* donde se observó formación de homodímeros resistentes a los reactivos desnaturalizantes de un SDS-PAGE en una mayor proporción incluso que la observada en este caso para las mismas condiciones (Mottram & Grant, 1996; Muñoz et al., 2006).

En el caso de la proteína TvCKs2 no se observó señal correspondiente a dímeros de esta proteína en el ensayo de Western blot, sin embargo, se pueden visualizar en el SDS-PAGE bandas de peso molecular equivalente al de los dímeros, pero en este caso de menor intensidad en comparación a las observadas en las eluciones de TvCKs1, posiblemente sea por ese motivo que no pudieron ser detectadas estas bandas por Western-blot.

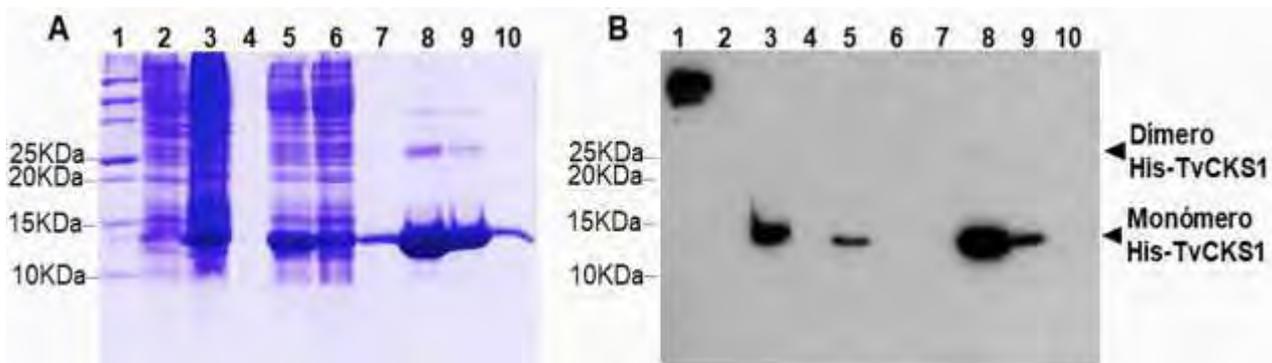


Figura 28. SDS PAGE y Western-blot de la proteína TvCKs1 expresada y purificada. Panel A: SDS-PAGE (Gel de poliacrilamida 15%); Panel B: Western-blot (la proteína recombinante TvCKs1 fue detectada con una sonda HisProbe-HRP_1:3000). Carril 1: Marcador de Peso Molecular. Carril 2: Cultivo sin inducir. Carril 3: Cultivo inducido (tiempo de inducción=4h). Carril 4: Fracción insoluble. Carril 5: Fracción soluble. Carril 6: Proteína que no se unió a la columna. Carril 7: Lavado 3. Carriles 8-10: Eluciones.

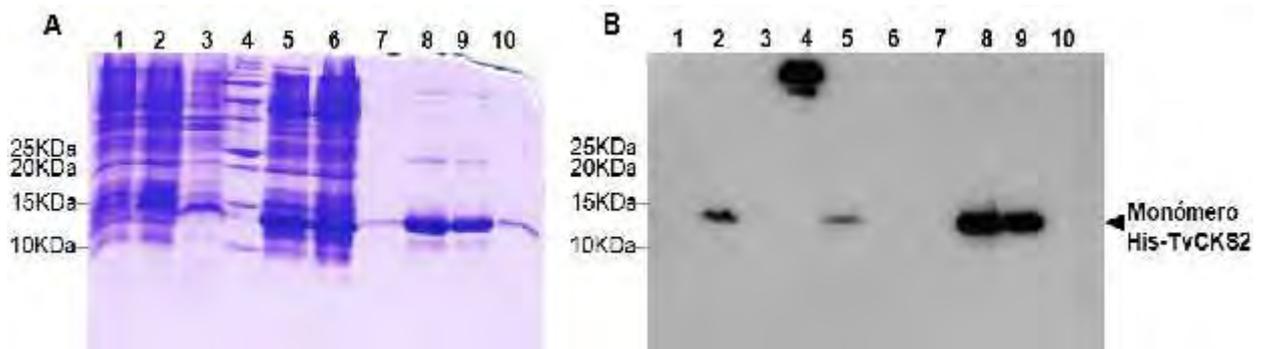


Figura 29. SDS PAGE y Western-blot de la proteína TvCKs2 expresada y purificada. Panel A: SDS-PAGE (Gel de poliacrilamida 15%); Panel B: Western-blot. (la proteína recombinante TvCKs1 fue detectada con una sonda HisProbe-HRP_1:3000). Carril 1: Cultivo sin inducir. Carril 2: Cultivo inducido (tiempo de inducción=4h). Carril 3: Fracción insoluble. Carril 4: Marcador de Peso Molecular. Carril 5: Fracción soluble. Carril 6: Proteína que no se unió a la columna. Carril 7: Lavado 3. Carriles 8-10: Eluciones.

4.5. Formación de dímeros de TvCKs1 y TvCKs2 recombinantes.

Para evaluar la formación de dímeros de TvCKs1 y TvCKs2 se varió la concentración de SDS en el amortiguador de corrida (de 0.1% a 0.05% de SDS) del SDS-PAGE y además se eliminó el β -mercaptoetanol del amortiguador de preparación de la muestra. Se probaron condiciones menos desnaturizantes variando las concentraciones de SDS para posibilitar en alguna medida el plegamiento de estas proteínas e interacciones entre los monómeros de estas y de esta manera poder visualizar con mayor claridad si existe formación de homodímeros.

La Figura 30 muestra un SDS-PAGE realizado con las condiciones descritas en (Sección 3.4.3) donde se compararon las proteínas recombinantes His-TvCKs1 y His-TvCKs2 preparadas con un amortiguador de muestra con β -mercaptoetanol (Figura 30, carriles 2 y 4, respectivamente) y sin β -mercaptoetanol (Figura 30, carriles 3 y 5, respectivamente). Igualmente, se evaluó una proteína control fusionada también a una etiqueta de 6 Histidinas hacia el N-terminal, His-CRK5, que es una cinasa dependiente de ciclina de *T. vaginalis* (Amador et al., 2017 que no forma dímeros. Esta se evaluó en iguales condiciones: en amortiguador de muestra con β -mercaptoetanol (Figura 30, carril 6) y sin β -mercaptoetanol (Figura 30, carril 7). Se apreció en el SDS-PAGE de las proteínas TvCKs1 y TvCKs2 en amortiguador de muestra con β -mercaptoetanol (Figura 30, panel A carriles 2 y 4, respectivamente) que aparece una banda intensa de aproximadamente 12 kDa que es al peso molecular de ambas proteínas. Fue corroborado por Western blot que estas bandas corresponden a los monómeros de TvCKs1 y TvCKs2 y no se observa otra banda adicional de mayor peso molecular que pudiera asociarse a un dímero u oligómero de mayor tamaño. Al evaluar por SDS-PAGE las proteínas His-TvCKs1 y His-TvCKs2 sin β -mercaptoetanol en el amortiguador de muestra (Figura 30, carriles 3 y 5), se pudieron observar dos bandas de 12 kDa y 24-25 kDa aproximadamente. Por Western-blot se comprobó que la banda

inferior corresponde al monómero de 12 kDa y la banda superior a un dímero del doble de peso molecular tanto en TvCKS1 con TvCKS2 (Figura 30, panel B, carriles 2 y 4, respectivamente). En el caso del control negativo de dimerización His-CRK5 se observó por SDS-PAGE que tanto con presencia de -mercaptoetanol (Figura 30, panel A. carril 6) como en ausencia de este (Figura 30, panel A, carril 6) se comporta de igual manera, observándose una banda solamente de alrededor de 32 kDa. Esta banda se comprobó por Western-blot (Figura 30, panel B, carril 6 y 7) que corresponde a un monómero de CRK5 y que no hay formación de dímeros en este caso, a diferencia de lo que ocurre con las CKSs de *T. vaginalis*. Este experimento demostró que TvCKS1 y TvCKS2 pueden formar homodímeros estables en condiciones semi-desnaturalizantes.

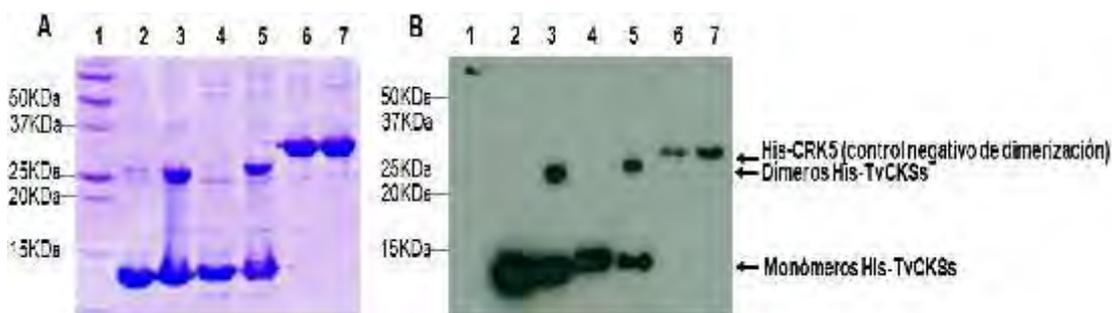


Figura 29. SDS PAGE y Western-blot de las proteínas His-TvCKS1 y His-TvCKS2 purificadas y bajo diferentes tratamientos. Panel A: SDS-PAGE (Gel de poliacrilamida 16%; Amortiguador de corrida 0.5 % SDS); Panel B: Western-blot. (La proteína recombinante His-TvCKS1 fue detectada con una sonda HisProbe-HRP_1:3000). Carril 1: Marcador de Peso Molecular. Carril 2: His-TvCKS1 en amortiguador de muestra con β-mercaptoetanol. Carril 3: His-TvCKS1 en amortiguador de muestra sin β-mercaptoetanol. Carril 4: His-TvCKS2 en amortiguador de muestra con β-mercaptoetanol. Carril 5: His-TvCKS2 en amortiguador de muestra sin β-mercaptoetanol. Carril 6: CRK5 en amortiguador de muestra con β-mercaptoetanol. Carril 7: CRK5 mezclado con amortiguador de muestra con β-mercaptoetanol.

5. Discusión de los resultados

En trabajos anteriores de nuestro laboratorio fueron identificados dos genes que codifican para las proteínas TvCKS1 y TvCKS2. Estas proteínas fueron caracterizadas parcialmente a través de alineamiento de secuencias, análisis

de ARN mensajero y patrón de poliadenilación, expresión y purificación de estas proteínas recombinantes e interacción con CRKs de *T. vaginalis* a través de un ensayo de doble híbrido. Permanecía como una incógnita la caracterización funcional de estas proteínas homólogas estructuralmente a otras CKSs ya identificadas como la Cks1 de *S. cerevisiae*. La complementación de mutantes de levadura ha sido un método ampliamente utilizado para la caracterización funcional de proteínas heterólogas (Lavigne & Volckaert, 2007). Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, en este trabajo evaluamos la capacidad de las proteínas TvCKS1 y TvCKS2 de complementar la ausencia de Cks1 en la levadura mutante *S. cerevisiae* y restablecer la progresión del ciclo celular.

Los resultados de este trabajo demuestran que tanto la proteína TvCKS1 como TvCKS2 complementan funcionalmente la mutante de *S. cerevisiae* deficiente en la proteína Cks1. Las TvCKSs comparten unos índices bajos de identidad y similitud de secuencia con su homólogo de *S. cerevisiae* siendo los valores de identidad de TvCKS1 y TvCKS2 en comparación con Cks1 de 28 % y 27 % respectivamente y los valores de similitud de 40 % y 38 % respectivamente. Además, las TvCKSs tienen un menor tamaño constituidas por 82 aminoácidos y con un peso molecular de 10 kDa respecto a los 150 aminoácidos y 18 kDa de Cks1 (Bourne, 2000). A pesar de estas diferencias estructurales, las TvCKSs permitieron la división de las mutantes deficientes en Cks1.

Un estudio en *T. cruzi*, un protista relacionado con *T. vaginalis*, arrojó resultados similares a los de este trabajo. La única CKS presente en este parásito, Tcp12 CKS1 pudo compensar una mutante nula de p13SUC1 en *S. pombe*, sugiriendo una posible relación funcional entre ellas. Esta fue otra prueba de complementación funcional entre proteínas de dos organismos distantes evolutivamente (Muñoz et al., 2006).

Las homólogas de humanos (CksHs1 y CksHs2), que muestran una identidad (>50 %) y similitud (>70%) altas con las TvCKSs, pudieron igualmente complementar la función de la Cks1 de *S. cerevisiae* (Richardson, 1990). Las CKSs de *H. sapiens* son proteínas de menor tamaño que las TvCKSs constituidas por 79 aminoácidos y con un peso molecular de 9 kDa significativamente menor que el peso molecular de la Cks1 de *S. cerevisiae*. A pesar de que las proteínas CksHs1 y CksHs2 comparten una identidad alta con

la Cks1 (>50 %) muestran diferencias notables con esta última como la delección de 9 aminoácidos en la parte central de la proteína presente en las CKSs humanas que no posee la Cks1 y las grandes extensiones en la región amino y carboxilo de Cks1 que no tienen las CKSs de humanos. Estas diferencias están presentes igualmente en las TvCKSs al comparar su secuencia de aminoácidos con la Cks1. Además de las características estructurales mencionadas, la Cks1 tiene una región de 16 glutaminas en el extremo carboxilo que no está presente en los homólogos reportados incluyendo la TvCKSs. La observación de que tanto p13suc1 de *S. pombe* como las CKSHs1 y CKSHs2 de humanos son capaces de reemplazar a Cks1 de *S. cerevisiae* para permitir el crecimiento mitótico normal de células de *S. cerevisiae* sugiere que la región de poliglutamina no realiza ninguna función esencial (Richardson, 1990; Bourne, 2000).

El comportamiento similar en los parámetros de crecimiento de las haploides mutantes complementadas con TvCKS1, TvCKS2 y el control positivo Cks1 de *S. cerevisiae*, fue un resultado no esperado. A pesar de que las proteínas TvCKS1 y TvCKS2 comparten un alto grado de identidad, los cambios aminoacídicos en sitios que se han descrito como importantes para la función de las familias de CKSs sugerían una diferencia en su capacidad de complementar la mutante deficiente en Cks1 de *S. cerevisiae*. Por otra parte, teniendo en cuenta que Cks1 es la proteína propia del sistema para probar complementación se esperaba que tuviera una mayor capacidad de complementación en comparación con las TvCKSs.

Similares resultados fueron obtenidos por Richardson et al., 1990 donde las proteínas CksHs1 y CksHs2 que comparten un menor grado de identidad entre ellas (81%) respecto a TvCKS1 y TvCKS2 (94%) tuvieron una similar capacidad para promover el crecimiento de una mutante deficiente en Cks1 de *S. cerevisiae*. De igual manera en este estudio se observó que la capacidad de complementar de las proteínas CKSs de humanos comparadas con la Cks1 silvestre fue semejante.

A los resultados del presente trabajo se añaden los obtenidos en un estudio anterior de este laboratorio. En este se demostró a través de un método de doble híbrido que se produce una interacción entre dos TvCRKs identificadas en *T. vaginalis* y las TvCKSs. La unión a las CDKs es una de las características

fundamentales que se estudia para la caracterización de las CKSs y en este caso el experimento fue realizado con CDKs del propio organismo *T. vaginalis*. De manera interesante, se observó un comportamiento diferente entre las dos TvCKSs, ya que mientras la interacción entre TvCRK2 y las TvCKSs por separado fue similar, la interacción de TvCRK1 con TvCKS1 fue considerablemente mayor que con TvCKS2. Esta variación en las interacciones se sugirió que podía estar relacionada con los cambios aminoacídicos entre estas TvCKSs, los cuales están ubicados en regiones relevantes para la interacción con las CDKs indicando una posible diferencia funcional entre ellas (Amador et al., 2017). Estos datos en conjunto apoyan con mayor solidez el papel de TvCKS1 y TvCKS2 como reguladores del ciclo celular en *T. vaginalis*. La formación de homodímeros es otro aspecto ampliamente valorado en la caracterización de las familias de CKSs desde el punto de vista estructural e indirectamente funcional (Rousseau et al., 1998;; Bourne et al., 2000; Seeliger et al., 2002, 2005; Balog et al., 2011). Se ha sugerido que el equilibrio monómero-dímero es un modo de regulación de la unión de las CKSs a las CDKs y por tanto de la función de las CKSs como reguladores del ciclo celular (Ganoth et al., 2011). Esta característica, se ha demostrado que es conservada en las CKSs de diferentes organismos (Bourne et al., 2000). Sin embargo, en las dos CKSs de humanos se ha observado diferencias en la tendencia a formar dímeros. CksHs1 tiende más a observarse en forma monomérica mientras que su homólogo CksHs2 es más estable en formas diméricas y hexaméricas (Arvai et al., 1995).

En el presente trabajo se demostró que tanto TvCKS1 como TvCKS2 además de observarse en su forma monomérica pueden formar dímeros como sus homólogos de CKSs de otros organismos. El empleo de un amortiguador de muestra sin β -mercaptoetanol posibilitó visualizar los dímeros al contrario de lo que ocurre en presencia de este. El β -mercaptoetanol, además de sus propiedades como agente reductor, se conoce que puede formar fácilmente puentes de hidrógeno a través de sus grupos SH y OH. Estos puentes de hidrógeno en algunas ocasiones pueden competir con los que se establecen entre moléculas como las proteínas (Wang et al., 2009). En un estudio en la enzima α -manosilasa de la planta *Canavalia ensiformis*, la cual carece de cisteínas, se observó que el β -mercaptoetanol promueve la separación de las

dos subunidades que la constituyen actuando como un solvente orgánico (Einhoff et al., 1987). En los dímeros de intercambio de dominio de hoja- en las CKSs cuya estructura se ha estudiado más a fondo, se ha demostrado que se estabilizan principalmente por puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas (Seeliger et al., 2002). Se ha reportado una excepción que es la Cks1 de *S. cerevisiae* la cual forma dímeros estabilizados por un puente disulfuro (Bourne, 2000). Teniendo en cuenta esto, es posible que igualmente el -mercaptoetanol actúe disociando los homodímeros de TvCKS1 y TvCKS2 desestabilizando los puentes de hidrógeno que pudieran intervenir en la formación de estas estructuras.

Otros aspectos apoyan la formación de homodímeros en las CKSs de *T. vaginalis*: uno de ellos es la presencia en sus secuencias del motivo consenso bisagra- (HXPEPH) que interviene en la formación de dímeros intercambiados. En TvCKS1 este motivo tiene la secuencia: His-60, Ala-61, Pro-62, Glu-63, Pro-64, Asn-65 y en TvCKS2: His-60, Asn-61, Pro-62, Glu-63, Pro-64, Asn-65 existiendo un cambio tanto en TvCKS1 y TvCKS2 de Asn-65 respecto a la secuencia canónica que tiene Histidina. Sin embargo, este cambio al ser conservativo puede que no sea relevante en la formación de dímeros y su implicación en comparación con otras CKSs.

Adicionalmente, las proteínas TvCKS1 y TvCKS2 pudieron complementar funcionalmente una mutante de *S. cerevisiae* deficiente en CKS1 y se ha demostrado que esta última puede formar dímeros intercambiados (Bourne et al., 2000).

Continúa siendo una incógnita por qué razón en *T. vaginalis* a diferencia de otros protistas, se han mantenido en la evolución dos CKSs. Pudiera deberse a que cada una tiene funciones específicas no redundantes en el ciclo celular de este parásito. Sin embargo, teniendo en cuenta la similitud tan alta de estas proteínas y su semejante capacidad de complementar la función de la Cks1, existe la posibilidad de que compartan funciones o interactúen para efectuarlas. La formación de heterodímeros pudiera ser considerada, aunque no se ha visto en los otros organismos que presentan igualmente dos genes de CKSs que codifican para proteínas con alta similitud (*H. sapiens*, *D. melanogaster* y *Caenorhabditis elegans*).

De acuerdo a lo mencionado, quedaría pendiente para un trabajo futuro identificar la función de las TvCKSs por separado y si existe interacción entre ellas lo cual permitirá una caracterización funcional más específica de estas proteínas.

6. Conclusiones.

- TvCKS1 y TvCKS2 complementan la función de Cks1 en *S. cerevisiae* sustentando su posible papel como reguladores del ciclo celular en *T. vaginalis*.
- TvCKS1 y TvCKS2 forman homodímeros al igual que se ha sugerido en otros organismos lo que posiblemente sea una forma de regulación de la función de estas CKSs en *T. vaginalis*.

7. Perspectivas.

- Evaluar “*in vivo*” la formación de homo y heterodímeros de TvCKs1 y TvCKs2 por el método de BIFC (Bimolecular fluorescence complementation).

- Evaluar la posible función de las proteínas TvCKs1 y TvCKs2 como reguladores de la transcripción.

8. Bibliografía.

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. & Walter P. (2010). Molecular biology of the cell, 5th edition. *Biochemistry and Molecular Biology*, 36(4), 317–318
- Amador, E., López-Pacheco, K., Morales, N., Coria, R. & López-Villaseñor, I. (2017). Characterization of cyclin-dependent kinases and Cdc2/Cdc28 kinase subunits in *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology*, 144(5), 571–582.
- Amon, A. (1998). Controlling cell cycle and cell fate: Common strategies in prokaryotes and eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 85–86.
- Andrews, B., & Measday, V. (1998). The cyclin family of budding yeast. *Trends in Genetics*, 14(97), 66–72.
- Arvai, A. S., Bourne, Y., Hickey, M. J., & Tainer, J. A. (1995). Crystal-Structure of the Human Cell-Cycle Protein Cks1-Single-Domain Fold with similarity to Kinase N-Lobe Domain. *Journal of Molecular Biology*, 249(5), 835–842.
- Balog, E. R. M., Saetern, O. C., Finch, W., Hoeft, C. O., Thai, V., Harvey, S. L., Rubin, S. M. (2011). The structure of a monomeric mutant Cks protein reveals multiple functions for a conserved hinge-region proline. *Journal of Molecular Biology*, 411(3), 520–528.
- Bedford, L., Paine, S., Sheppard, P. W., Mayer, R. J., & Roelofs, J. (2011). Assembly, Structure and Function of the 26S proteasome, *NIH Public Access*, 20(7), 391–401.
- Benchimol, M. (2004). Trichomonads under Microscopy, *Microscopy Microanalysis*, 10, 528–550.
- Bouchemal, K., Bories, C., & Loiseau, P. M. (2017). Strategies for Prevention and Treatment of *Trichomonas vaginalis* Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 30(3), 811–825.
- Boudolf, V., Rombauts, S., Naudts, M., Inzé, D., & De Veylder, L. (2001). Identification of novel cyclin-dependent kinases interacting with the CKS1 protein of *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 52(359), 1381–1382.
- Bourne, Y., Watson, M. H., Arvai, A. S., Bernstein, S. L., Reed, S. I., & Tainer, J. A. (2000). Crystal structure and mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle regulatory protein Cks1: implications for domain swapping, anion binding and protein interactions. *Structure*, 8(8), 841–850.
- Bourne, Y., Watson, M. H., Hickey, M. J., Holmes, W., Rocque, W., Reed, S. I., & Tainer, J. A. (1996). Crystal structure and mutational analysis of the human CDK2 kinase complex with cell cycle-regulatory protein CksHs1. *Cell*, 84(6), 863–874.
- Brown, N. R., Korolchuk, S., Martin, M. P., Stanley, W. A., Moukhametzianov, R., Noble, M. E. M., & Endicott, J. A. (2015). CDK1 structures reveal conserved and unique features of the essential cell cycle CDK. *Nature Communications*, 6, 1–28.
- Canavese, M., Santo, L., & Raje, N. (2012). Cyclin dependent kinases in cancer Potential for therapeutic intervention. *Cancer Biology & Therapy* 13(7), 451–457.

- Carlton, J. M., Hirt, R. P., Silva, J. C., Delcher, A. L., Schatz, M., Zhao, Q., ... Johnson, P. J. (2007). Draft Genome Sequence of the Sexually Transmitted Pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science*, 315(5809), 207–212.
- Castillo, V., & Harris, R. (2013). Protozoa: Biology, Classification and Role in Disease. Nova Science.
- Dacks, J. B., Walker, G., & Field, M. C. (2008). Implications of the new eukaryotic systematics for parasitologists. *Parasitology International*, 57(2), 97–104.
- Doerig C., Chakrabarti D., Kappes B., Matthews K. (2000) The cell cycle in protozoan parasites. In: Meijer L., Jézéquel A., Ducommun B. (eds) Progress in Cell Cycle Research. Progress in Cell Cycle Research. Springer, Boston, MA.
- Einhoff, W., Kummer, H., & Rüdiger, H. (1987). Mercaptoethanol assists in cleaving a cysteine/cystine-free protein into its subunits. *Biol. Chem.*, 368(1), 405–407.
- Errico, A., Deshmukh, K., Tanaka, Y., Pozniakovsky, A., & Hunt, T. (2010). Identification of substrates for cyclin dependent kinases. *Advances in Enzyme Regulation*, 50(1), 375–399.
- Fichorova, R., Fraga, J., Rappelli, P., & Fiori, P. L. (2017). *Trichomonas vaginalis* infection in symbiosis with *Trichomonas virus* and *Mycoplasma*. *Research in Microbiology*, 168(9–10), 882–891.
- Fisher, D., Krasinska, L., Coudreuse, D., & Novak, B. (2012). Phosphorylation network dynamics in the control of cell cycle transitions. *Journal of Cell Science*, 125(20), 4703–4711.
- Ganoth, D., Bornstein, G., Ko, T. K., Larsen, B., Tyers, M., Pagano, M., & Hershko, A. (2001). The cell cycle regulatory protein Cks1 is required for SCFSkp2 mediated ubiquitinylation of p27. *Nature Cell Biology*, 3(3), 321–327.
- Gerbod D., Edgcomb V. P., Noël Ch., Delgado-Viscogliosi P. & Eric Viscogliosi. (2000). Phylogenetic position of parabasalid symbionts from the termite *Calotermes flavicollis* based on small subunit rRNA sequences. *Internat Microbiol.* 3.165–172.
- Ghorbani, M., Vasavan, B., Kraja, E., & Swan, A. (2011). Cks85A and Skp2 interact to maintain diploidy and promote growth in *Drosophila*. *Developmental Biology*, 358(1), 213–223.
- Ghosh, I., Muwonge, R., Mittal, S., Banerjee, D., Kundu, P., Mandal, R., & Basu, P. (2017). Association between high risk human papillomavirus infection and co-infection with *Candida* spp. and *Trichomonas vaginalis* in women with cervical premalignant and malignant lesions. *Journal of Clinical Virology*, 87, 43–48.
- Gómez-Conde, E., Mena-López, R., Hernández-Jaúregui, P., González-Camacho, M., & Arroyo, R. (2000). *Trichomonas vaginalis*: Chromatin and mitotic spindle during mitosis. *Experimental Parasitology*, 96(3), 130–138.
- González A. y Valenzuela L. (2001). *Saccharomyces cerevisiae*. En: Esperanza Martínez Romero y Julio César Martínez Romero (Eds). *Microbios* (Capítulo 16). México. <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/index.html>.
- Gram, I. T., Macaluso, M., Churchill, J., & Stalsberg, H. (1996). *Trichomonas vaginalis* (TV) and human papillomavirus (HPV) infection and the incidence of

- cervical intraepithelial neoplasia (CIN) grade III. *Cancer Causes & Control*, 3(3), 231–236.
- Grant, K. M., Hassan, P., Anderson, J. S., & Mottram, J. C. (1998). The crk3 Gene of *Leishmania Mexicana* encodes a Stage-regulated cdc2-related Histone H1 Kinase That Associates with p12cks1. *Journal of Biological Chemistry*, 273(17), 10153–10159.
- Hadwiger, J. A., Wittenberg, C., Mendenhall, M. D., & Reed, S. I. (1989). The *Saccharomyces cerevisiae* CKS1 gene, a homolog of the *S. pombe* suc1+ gene, encodes a subunit of the cdc28 protein kinase complex. *Mol Cell Biol*, 9(5), 2034–2041.
- Hammarton, T. C. (2007). Cell cycle regulation in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 153(1), 1–8.
- Hampl, V., Hug, L., Leigh, J. W., Dacks, J. B., Lang, B. F., Simpson, A. G. B., & Roger, A. J. (2009). Phylogenomic analyses support the monophyly of Excavata and resolve relationships among eukaryotic “supergroups.” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(10), 3859–3864.
- Harashima, H., Dissmeyer, N., & Schnittger, A. (2013). Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. *Trends in Cell Biology*, 23(7), 345–356.
- Harp, D. F., & Chowdhury, I. (2011). Trichomoniasis: evaluation to execution. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 157(1), 3–9.
- Harper, J. W. (2001). Protein destruction: Adapting roles for Cks proteins. *Current Biology*, 11(11), 431–435.
- Hassan, P., Fergusson, D., Grant, K. M., & Mottram, J. C. (2001). The CRK3 protein kinase is essential for cell cycle progression of *Leishmania mexicana*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 113(2), 189–198.
- Hayles, J., Aves, S., & Nurse, P. (1986a). Suc1 Is an Essential Gene Involved in Both the Cell Cycle and Growth in Fission Yeast. *The EMBO Journal*, 5(12), 3373–3379.
- Hayles, J., Beach, D., Durkacz, B., & Nurse, P. (1986b). The fission yeast cell cycle control gene cdc2: isolation of a sequence suc1 that suppresses cdc2 mutant function. *Molecular & General Genetics*, 202(2), 291–293.
- Hindley, J., Phear, G., Stein, M., & Beach, D. (1987). Suc1+ encodes a predicted 13-kilodalton protein that is essential for cell viability and is directly involved in the division cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol*, 7(1), 504–511.
- Hirt, R. P. (2013). *Trichomonas vaginalis* virulence factors: An integrative overview. *Sexually Transmitted Infections*, 89(6), 439–443.
- Hochegger, H., Takeda, S., & Hunt, T. (2008). Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9, 910.
- Holt, L. J., Tuch, B. B., Villén, J., Johnson, A. D., Gygi, S. P., & Morgan, D. O. (2009). Global analysis of Cdk1 substrate phosphorylation sites provides insights into evolution. *Science*, 325(5948), 1682.

- Invitrogen. (2008). pYES2 Manual. *Life Technologies Corporation*, (December), 1–28. Retrieved from [papers2://publication/uuid/11BA72BF-7B0A-4078-AE42-8EAA5EF89270](https://pubs2://publication/uuid/11BA72BF-7B0A-4078-AE42-8EAA5EF89270)
- Kaiser, P., Moncollin, V., Clarke, D. J., Watson, M. H., Bertolaet, B. L., Reed, S. I., & Bailly, E. (1999). Cyclin-dependent kinase and Cks/Suc1 interact with the proteasome in yeast to control proteolysis of M-phase targets. *Genes and Development*, 13(9), 1190–1202.
- Kalra, S., Joshi, G., Munshi, A., & Kumar, R. (2017). Structural insights of cyclin dependent kinases: Implications in design of selective inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 142, 424–458.
- Khare, A. K., Singh, B. & Singh, J. (2011), A fast and inexpensive method for random spore analysis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, 28(7): 527-533.
- Khattar, V., & Thottassery, J. V. (2013). Cks1: Structure, Emerging Roles and Implications in Multiple Cancers. *Journal of Cancer Therapy*, 4(8), 1341–1354.
- Khattar, V., Fried, J., Xu, B., & Thottassery, J. V. (2015). Cks1 proteasomal degradation is induced by inhibiting Hsp90-mediated chaperoning in cancer cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 75(2), 411–420.
- Kissinger, P. (2015). *Trichomonas vaginalis*: A review of epidemiologic, clinical and treatment issues. *BMC Infectious Diseases*, 15(1), 1–8.
- Kõivomägi, M., Örd, M., Iofik, A., Valk, E., Venta, R., Faustova, I., ... Loog, M. (2013). Multisite phosphorylation networks as signal processors for Cdk1. *Nature Structural & Molecular Biology*, 20(12), 10.
- Kõivomägi, M., Valk, E., Venta, R., Iofik, A., Lepiku, M., Balog, E. R. M., ... Loog, M. (2011). Cascades of multisite phosphorylation control Sic1 destruction at the onset of S phase. *Nature*, 480, 128-132.
- Krishnan, A., Nair, S. A., & Pillai, M. R. (2010). Loss of cks1 homeostasis deregulates cell division cycle. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(1–2), 154–164.
- Kusdian, G., & Gould, S. B. (2014). The biology of *Trichomonas vaginalis* in the light of urogenital tract infection. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 198(2), 92–99.
- Kusdian, G., & Gould, S. B. (2014). The biology of *Trichomonas vaginalis* in the light of urogenital tract infection. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 198(2), 92–99.
- Lavigne, R., & Volckaert, G. (2007). Functional complementation in *Saccharomyces cerevisiae* under control of the natural yeast promoter. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10(2), 322–327.
- Lloyd, D. (1996). Obligate anaerobe or not? *Nature*, 381, 121.
- Loker E. S. and Hofkin. B. V. (2016). *Parasitology: A Conceptual Approach*. New York: Garland Science (Taylor & Francis Group).
- Loog, M., & Morgan, D. O. (2005). Cyclin specificity in the phosphorylation of cyclin-dependent kinase substrates. *Nature*, 434(3), 104–108.
- Lu, K. P., Hanes, S. D., & Hunter, T. (1996). A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis. *Nature* 380(6574), 544-7.

- Malik, S. B., Brochu, C. D., Bilic, I., Yuan, J., Hess, M., Logsdon, J. M., & Carlton, J. M. (2011). Phylogeny of parasitic parabasalia and free-living relatives inferred from conventional markers vs. Rpb1, a single-copy gene. *PLoS ONE*, 6(6).
- Malla, N., Goyal, K., Dhanda, R. S., & Yadav, M. (2014). Immunity in urogenital protozoa. *Parasite Immunology*, 36(9), 400–408.
- Malumbres, M. (2014). Cyclin-dependent kinases. *Genome Biology*, 15(6), 122.
- Malumbres, M., Harlow, E., Hunt, T., Hunter, T., Lahti, J. M., Manning, G., ... Wolgemuth, D. J. (2009). Cyclin-dependent kinases: a family portrait. *Nature Cell Biology*, 11(11), 1275–1276.
- Martin, W. (2006). The missing link between hydrogenosomes and mitochondria. *Trends in microbiology*, 13(10), 457-458.
- Martinsson-Ahlzen, H.-S., Liberal, V., Grunenfelder, B., Chaves, S. R., Spruck, C. H., & Reed, S. I. (2008). Cyclin-Dependent Kinase-Associated Proteins Cks1 and Cks2 Are Essential during Early Embryogenesis and for Cell Cycle Progression in Somatic Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 28(18), 5698–5709.
- McGrath, D. A., Balog, E. R. M., Kõivomägi, M., Lucena, R., Mai, M. V., Hirschi, A., ... Rubin, S. M. (2013). Cks Confers Specificity to Phosphorylation-Dependent Cdk Signaling Pathways. *Nature Structural & Molecular Biology*, 20(12), 1407–1414.
- Mendenhall, M. D., & Hodge, A. E. (1998). Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(4), 1191–1243.
- Menezes, C. B., Amanda Piccoli Frasson, A. P., & Tasca, T. (2016). Trichomoniasis – are we giving the deserved attention to the most common non-viral sexually transmitted disease worldwide? *Microbial Cell*, 3(9), 404–418.
- Meza-Cervantez, P., González-Robles, A., Cárdenas-Guerra, R. E., Ortega-López, J., Saavedra, E., Pineda, E., & Arroyo, R. (2011). Pyruvate: Ferredoxin oxidoreductase (PFO) is a surface-associated cell-binding protein in *Trichomonas vaginalis* and is involved in trichomonal adherence to host cells. *Microbiology*, 157(12), 3469–3482.
- Miller, K. H., Karr, J. R., & Marqusee, S. (2010). A Hinge Region cis-Proline in Ribonuclease A Acts as a Conformational Gatekeeper for C-Terminal Domain Swapping. *Journal of Molecular Biology*, 400(3), 567–578.
- Mironov V., De Veylder L., Van Montagu M., & Inzé D. (1999). Cyclin-Dependent Kinases and Cell Division in Plants— The Nexus. *The Plant Cell*, 11, 509–521.
- Morales N. (2015). Caracterización de CKS1 y CKS2, subunidades reguladoras de las CDKs en *Trichomonas vaginalis* (Tesis de maestría). UNAM. Ciudad de México, México.
- Morgan D. O. (2007). Cell Cycle: Principles of Control. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 80(3), 141–142.

- Morris MC, et al. (2003) Cks1-dependent proteasome recruitment and activation of CDC20 transcription in budding yeast. *Nature* 423(6943):1009-13.
- Mottram, J. C., & Grant, K. M. (1996). Leishmania mexicana p12cks1, a homologue of fission yeast p13suc1, associates with a stage-regulated histone H1 kinase. *Biochemical Journal* 316(3), 833–839.
- Müller, M., Mentel, M., van Hellemond, J. J., Henze, K., Woehle, C., Gould, S. B., Martin, W. F. (2012). Biochemistry and Evolution of Anaerobic Energy Metabolism in Eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(2), 444–495.
- Muñoz, M. J., Santori, M. I., Rojas, F., Gómez, E. B., & Téllez-Iñón, M. T. (2006). Trypanosoma cruzi Tcp12CKS1 interacts with parasite CRKs and rescues the p13SUC1 fission yeast mutant. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 147(2), 154–162.
- Neiman, A. M. (2005). Ascospore Formation in the Yeast Saccharomyces cerevisiae Ascospore Formation in the Yeast Saccharomyces cerevisiae. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(4), 565–584.
- Paget, T. A., & Lloyd, D. (1990). Trichomonas vaginalis requires traces of oxygen and high concentrations of carbon dioxide for optimal growth. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 41(1), 65–72.
- Pan, Y. R., Sun, M., Wohlschlegel, J., & Reed, S. I. (2013). Cks1 enhances transcription efficiency at the GAL1 locus by linking the Paf1 complex to the 19S proteasome. *Eukaryotic Cell*, 12(9), 1192–1201.
- Parge, H. E., Arvai, A. S., Murtari, D. J., Reed, S. I., & Tainer, J. A. (1993). Human CksHs2 atomic structure: a role for its hexameric assembly in cell cycle control. *Science*, 262(5132), 387-395.
- Patra, D., & Dunphy, W. G. (1998). Xe-p9, a Xenopus Suc1/Cks protein, is essential for the Cdc2-dependent phosphorylation of the anaphase-promoting complex at mitosis. *Genes & Development*, 12(16), 2549–2559.
- Patra, D., Wang, S. X., Kumagai, A., & Dunphy, W. G. (1999). The Xenopus Suc1/Cks Protein Promotes the Phosphorylation of G2/M Regulators. *Biochemistry*, (7), 36839–36842.
- Pavletich, N. P. (1999). Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of cdks, their cyclin activators, and cip and INK4 inhibitors1. *Journal of Molecular Biology*, 287(5), 821–828.
- Pereira-Neves, A., Ribeiro, K. C., & Benchimol, M. (2003). Pseudocysts in Trichomonads – New Insights. *Protist*, 154(3), 313–329.
- Petrin, D., Delgaty, K., Bhatt, R., & Garber, G. (1998). Clinical and microbiological aspects of Trichomonas vaginalis. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(2), 300–317.
- Polinko, E. S., & Strome, S. (2000). Depletion of a Cks homolog in C. elegans embryos uncovers a post-metaphase role in both meiosis and mitosis. *Current Biology*, 10(22), 1471–1474.
- Preisner, H., Karin, E. L., Poschmann, G., Stühler, K., Pupko, T., & Gould, S. B. (2016). The Cytoskeleton of Parabasalian Parasites Comprises Proteins that

- Share Properties Common to Intermediate Filament Proteins. *Protist*, 167(6), 526–543.
- Ribeiro, K. C., Monteiro-Leal, L. H., & Benchimol, M. (2000). Contributions of the axostyle and flagella to closed mitosis in the protists *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 47(5), 481–492.
- Richardson, H. E., Stueland, C. S., Thomas, J., Russell, P., & Reed, S. I. (1990). Human cDNAs encoding homologs of the small p34Cdc28/Cdc2-associated protein of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes & Dev.* 4(8)1332-1344.
- Riley, D. E., Krieger, J. N., Miner, D., & Rabinovitch, P. S. (1994). *Trichomonas vaginalis*: Dominant G2 Period and G2 Phase Arrest in a Representative of an Early Branching Eukaryotic Lineage. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 41(4), 408–414.
- Rousseau, F., Schymkowitz, J. W. H., Wilkinson, H. R., & Itzhaki, L. S. (2002). The Structure of the Transition State for Folding of Domain-Swapped Dimeric p13suc1. *Structure*, 10(5), 649–657.
- Rousseau, F., Schymkowitz, J. W., Sánchez del Pino, M., & Itzhaki, L. S. (1998). Stability and folding of the cell cycle regulatory protein, p13(suc1). *Journal of Molecular Biology*, 284(2), 503–519.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Vol. 1, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Santori, M. I., Laria, S., Gómez, E. B., Espinosa, I., Galanti, N., & Téllez-Iñón, M. T. (2002). Evidence for CRK3 participation in the cell division cycle of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 121(2), 225–232.
- Seeliger, M. A., Schymkowitz, J. W. H., Rousseau, F., Wilkinson, H. R., & Itzhaki, L. S. (2002). Folding and Association of the Human Cell Cycle Regulatory Proteins cks1 and cks2. *Biochemistry*, 41(4), 1202–1210.
- Seeliger, M. A., Spichty, M., Kelly, S. E., Bycroft, M., Freund, S. M. V., Karplus, M., & Itzhaki, L. S. (2005). Role of conformational heterogeneity in domain swapping and adapter function of the Cks Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 280(34), 30448–30459
- Siddiqi, B. A. (1971). Random-spore analysis in *Saccharomyces*. *Hereditas*, 69(1), 67–76.
- Smith, A., & Johnson, P. (2011). Gene expression in the unicellular eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Research in microbiology*, 162(6):646-54.
- Spruck, C., Strohmaier, H., Watson, M., Smith, A. P. L., Ryan, A., Krek, W., & Reed, S. I. (2001). A CDK-independent function of mammalian Cks1: Targeting of SCFSkp2 to the CDK inhibitor p27Kip1. *Molecular Cell*, 7(3), 639–650.
- Srivastava, L. M. (2002). *Plant Growth and Development: Hormones and Environment*. Elsevier Science. Retrieved from <https://books.google.com.mx/books?id=wXLBKdncciQC>.
- Stockwell S. R., Landry Ch. R. & Rifkin S. A. (2015). The yeast galactose network as a quantitative model for cellular memory. *Mol Biosyst*, 11(1), 28–37.

- Sudakin, V., Shteinberg, M., Ganoth, D., Hershko, J., & Hershko, A. (1997). Binding of Activated Cyclosome to p13^{suc1}. *Journal of Biological Chemistry*, 272(29), 18051–18059.
- Sutcliffe, S., Neace, C., Magnuson, N. S., Reeves, R., & Alderete, J. F. (2012). Trichomonosis, a Common Curable STI, and Prostate Carcinogenesis-A Proposed Molecular Mechanism. *PLoS Pathogens*, 8(8), 1–4.
- Suwanmajo, T., & Krishnan, J. (2015). Mixed mechanisms of multi-site phosphorylation. *Journal of the Royal Society Interface*, 12(107), 1-17.
- Swan, A., Barcelo, G., & Schupbach, T. (2005). *Drosophila* Cks30A interacts with Cdk1 to target Cyclin A for destruction in the female germline. *Development*, 132(16), 3669–3678.
- Tanabe, M. (1979). *Trichomonas vaginalis*: NADH oxidase activity. *Experimental Parasitology*, 48(1), 135–143.
- Tang, Y., & Reed, S. I. (1993). The Cdk-associated protein Cks1 functions both in G₁ and G₂ in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes and Development*, 7, 822–832.
- Tu, X., & Wang, C. C. (2004). The Involvement of Two cdc2-related Kinases (CRKs) in *Trypanosoma brucei* Cell Cycle Regulation and the Distinctive Stage-specific Phenotypes Caused by CRK3 Depletion. *Journal of Biological Chemistry*, 279(19), 20519–20528.
- Twu, O., de Miguel, N., Lustig, G., Stevens, G. C., Vashisht, A. A., Wohlschlegel, J. A., & Johnson, P. J. (2013). *Trichomonas vaginalis* Exosomes Deliver Cargo to Host Cells and Mediate Host:Parasite Interactions. *PLoS Pathogens*, 9(7), 22–24.
- Van Hellemond, J. J., & Mottram, J. C. (2000). The CYC3 gene of *Trypanosoma brucei* encodes a cyclin with a short half-life. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 111(2), 275–282.
- Van Zon, W., Ogink, J., Ter Riet, B., Medema, R. H., Te Riele, H., & Wolthuis, R. M. F. (2010). The APC/C recruits cyclin B1-Cdk1-Cks in prometaphase before D box recognition to control mitotic exit. *Journal of Cell Biology*, 190(4), 587–602.
- Wach, A., Brachat, A., Pöhlmann, R., Philippsen, P. (1994). New heterologous modules for classical or PCR based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 10(13), 793-808.
- Walker, R. G., Thomson, G., Malone, K., Nowicki, M. W., Brown, E., Blake, D. G., Mottram, J. C. (2011). High throughput screens yield small molecule inhibitors of leishmania CRK3:CYC6 cyclin-dependent kinase. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(4).
- Wang, N. N., Li, Q. Z., & Yu, Z. W. (2009). Hydrogen bonding interactions in three 2-mercaptoethanol systems: An excess infrared spectroscopic study. *Applied Spectroscopy*, 63(12), 1356–1362.
- Westbrook, L., Manuvakhova, M., Kern, F. G., Estes, N. R., Ramanathan, H. N., & Thottassery, J. V. (2007). Cks1 regulates cdk1 expression: A novel role during mitotic entry in breast cancer cells. *Cancer Research*, 67(23), 11393–11401.

Wolgemuth, D. J., Manterola, M., & Vasileva, A. (2013). Role of cyclins in controlling progression of mammalian spermatogenesis. *The International Journal of Developmental Biology*, 57(0), 159–168.

World Health Organization. (2012). Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections-2008. Who, Geneva, 1–28.

Xu, L., Fan, S., Zhao, J., Zhou, P., Chu, S., Luo, J., Shi, L. (2017). Increased expression of Cks1 protein is associated with lymph node metastasis and poor prognosis in nasopharyngeal carcinoma. *Diagnostic Pathology*, 12(1), 1–7.

9. Anexos

Anexo I Oligonucleótidos para reacciones de PCR

Nombre	Pares de bases	Temperatura media (°C)	Secuencia
KanMX CKS1- Fo	64	62.5	5´TACAACCTAGATTGACACGCACTTACTCTCGT CTTACAGTACTCCAGCTGAAGCTTCGTACG3´
KanMX. CKS1- Re	64	64	5´CTTGAAAAGGAATTCAATTTTCAGTAATTAGA GTATATCAAAGGCATAGGCCACTAGTGGATCT G3´
CKS1A. conf-Fo	25	59.2	5´GCTCGAAGAATTTTCAGATAAAACA3
CKS1D. conf-Re	25	62.5	5´TTCTAGTTGACTAGTTTTGGAGCGT3´
Conf.pF 6a-Re	20	53.8	5´TCGCGAGCCCATTTATACCC3´
TvCKS1 -EcoRI- F	31	60.9	5´TAGAATTCAGTGTTGACGATATCAGGTACTC 3´
TvCKS2 -EcoRI- F	33	60.9	5´TAGAATTCAGTGTTGACGAGATTATATACTC AG3´
p13Suc 1-Xho-R	36	61.7	5´TATCCTCGAGTTAAAGGGCATCTTTAGGAAC ATTTC3´

Anexo II Medios de cultivo

Medios de cultivo para Levaduras

Medio rico (YPD)

	Líquido	Sólido
Extracto de Levadura	10g	10g
Peptona	20g	20g
Dextrosa anhidra	20g	20g
Agar		20g
Agua bidestilada	1L	1L

Disolver los componentes en agua bidestilada y esterilizar en autoclave

Medio YPGal/Raf

	Líquido	Sólido
Extracto de Levadura	10 g	10 g
Peptona	20 g	20 g
Galactosa	100 mL	100 mL
Rafinosa	100 mL	100 mL
Agar		20 g
Agua bidestilada	800 mL	800 mL

Disolver todos los componentes en agua bidestilada excepto la Galactosa y/o Rafinosa y esterilizar en autoclave. Posteriormente adicionar las fuentes de carbono.

Soluciones stock previamente esterilizadas por filtración (0.22µm)

Galactosa al 20%

Rafinosa al 10%

Medio Mínimo 1 Dextrosa MM1/Dextrosa

	<u>Sólido</u>
YNB w/o aminoacids	6.7 g
Dextrosa	20 g
Nutrientes adicionales	Ver tabla de nutrientes adicionales
Agar	25 g
Agua bidestilada	880 mL

Medio Mínimo 1 Galactosa-Rafinosa (MM1/Gal/Raf)

	Líquido	Sólido
YNB w/o aminoacids	6.7 g	6.7 g
Galactosa	100 mL	100 mL
Rafinosa	20 mL	20 mL
Nutrientes adicionales	Ver tabla de nutrientes adicionales	
Agar		25 g
Agua bidestilada	880 mL	880 mL

Medio Mínimo 2 Galactosa-Rafinosa (MM2/Gal/Raf)

	Sólido
YNB sin amonio	1.7 g
Acido glutámico	1 g
Galactosa	100 mL
Rafinosa	20 mL
Agar	25 g
Agua bidestilada	880 mL

Disolver todos los componentes en agua bidestilada excepto la Galactosa y/o Rafinosa y esterilizar en autoclave. Posteriormente adicionar las fuentes de carbono.

Utilizar los stocks de Galactosa y Rafinosa empleados para la preparación del medio YPGalRaf.

Tabla de concentraciones de nutrientes adicionales para medio mínimo

Nutriente	Concentración stock (g/100 mL)	Volumen del stock para 1L (mL)	Concentración final en el medio (mg/L)
-----------	--------------------------------	--------------------------------	--

Adenina	0.2	10	20
Uracilo	0.2	10	20
L-Triptófano	0.2	10	20
L-Histidina	1	2	20
L-Metionina	1	2	20
L-Leucina	1	10	100
L-Lisina	1	3	30

Disolver los stocks en 100 mL de agua bidestilada y esterilizar en autoclave. Usar en condiciones de esterilidad y conservar a TA.

Nota importante: La Histidina y el Triptófano deben ser conservados protegidos de la luz

Medio de pre-esporulación

	Sólido
Extracto de levadura	0.8g
Peptona	0.3g
Dextrosa anhidra	10g
Agar	2g
Agua bd c.b.p.	1000 mL

Disolver los ingredientes en agua bidestilada y esterilizar en autoclave.

Medio Mínimo de esporulación

	Sólido
Acetato de potasio	10 g
Agar	20 g
Agua bd c.b.p.	1000 mL

Agregar las auxotrofías que correspondan de acuerdo con lo indicado en la tabla.

Disolver los ingredientes en agua bidestilada y esterilizar en autoclave.

Tabla de concentraciones de nutrientes adicionales para medio mínimo de esporulación

Nutriente	Concentración stock (g/100 mL)	Volumen del stock para 1L (mL)	Concentración final en el medio (mg/L)
Adenina	0.2	2.5	5
Uracilo	0.2	2.5	5
L-Triptófano	0.2	2.5	5

L-Histidina	1	0.5	5
L-Metionina	1	0.5	5
L-Leucina	1	2.5	25
L-Lisina	1	0.75	7.5

Disolver los stocks en 100 mL de agua bidestilada y esterilizar en autoclave. Usar en condiciones de esterilidad y conservar a TA.

Nota importante: La Histidina y el Triptófano deben ser conservados protegidos de la luz

Medio de cultivo para bacterias

Medio Luria Bertani (LB)

	Líquido	Sólido
Peptona	10 g	10 g
Extracto de Levadura	5g	5g
NaCl	5g	5g
NaOH 10M	0.3 mL	0.3 mL
Tris 1M pH 8	10 mL	10 mL
Agar		15g
Agua bd c.b.p.	1000 mL	1000mL

<u>Antibiótico</u>	Concentración de stock	Concentración final en el medio de cultivo
Ampicilina	100 mg/mL	100 µg/mL
Kanamicina	50 mg/mL	50 µg/mL
Geneticina	200 mg/mL	200 µg/mL

* Se diluye en agua estéril y se filtra con membrana de 0.22 µm.

IPTG

Concentración de stock	Concentración final
1M	1mM

Anexo III Soluciones y Amortiguadores

Amortiguador TE 10X pH 7.5

Tris-HCl 100 mM, pH 7.5	Stock: 1M, pH 8	10 mL
EDTA 10 mM, pH 8	Stock: 0.5M, pH 8	2 mL

Preparar a partir de las soluciones stock, aforar a 100 ml con agua bidestilada y esterilizar en autoclave.

Solución TEL

Amortiguador TE 10X	100 µL
Acetato de Litio 1M	100 µL
Agua bidestilada	800 µL

Preparar al momento a partir de las soluciones stock ya estériles.

Solución TELP

Amortiguador TE 10x, pH 7.5	100 µL
-----------------------------	--------

Extracción de DNA genómico de levadura

Solución A.

Tritón X-100	2%
SDS	1%
NaCl	100 mM
Tris HCL pH-8	10 mM
Na-EDTA	1mM

Solución B

Se prepara al momento. Se usa 1 mL por muestra.

Fenol: Cloroformo: Alcohol isoamílico (25: 24:1)

Acetato de litio 1M	100 µL
PEG 4000 al 50 %	800 µL

Transformación de levaduras

Acetato de Litio, 1M

Disolver en agua, aforar y esterilizar por filtración.

Amortiguador TE, pH 7.5

Tris HCl 10 Mm, pH 7.5

Preparar a partir de los stocks y esterilizar en autoclave.

EDTA 1mM pH 8

Preparar a partir de los stocks y esterilizar en autoclave.

DNA de esperma de salmón 10 mg/mL

Ver protocolo de preparación: Invitrogen cat: 15632-011

PEG 4000 al 40% en agua bidestilada

Disolver en la mitad del volumen final, aforar y filtrar a través de una membrana de 0.22µm.

SDS-PAGE semi-desnaturalizante

Stock de Acrilamida

Acrilamida	29.2g
Bis-acrilamida	0.8g

Disolver, aforar y filtrar con papel Whatman. Almacenar en frasco protegido de la luz y en refrigeración.

Preparar al momento a partir de las soluciones stock ya estériles. Se usan 300 µl por cada evento de transformación.

Gel separador 15%

5mL Stock de Acrilamida
 2.5 mL Amortiguador separador
 2.4 mL Agua bidestilada
 100 µL persulfato de amonio (PSA) al 10 %
 4 µL Tetrametiletilendiamina (TEMED)

Gel concentrador 5%

0.83 µL Stock de Acrilamida
 1.3 µL Amortiguador concentrador
 2.9 µL Agua bidestilada
 50 µL PSA
 5 µL TEMED

Amortiguador separador

Trizma base	18.17g	Concentración final: 1.5M
SDS	0.4g	0.4%

Amortiguador concentrador

Trizma base	6.06 g	Concentración final:0.5 M
SDS	0.4g	0.4%

Amortiguador de corrida 10x, 1L

Trizma base	30.3g
Glicina	142.7g

Amortiguador de corrida 1x, 1L

Agua bidestilada	895 mL
Amortiguador de corrida 10x	100 mL
SDS al 10 %	5 mL

Transferencia de proteínas

Solución de transferencia, 1L

NaHCO ₃	0.84g
NaCO ₃	0.32 g
Metanol	200 mL

Disolver los reactivos en agua destilada y aforar a 800 mL, agregar el metanol y mezclar. Esta solución puede ser reutilizada. Esta solución puede ser reutilizada hasta 4 veces siempre que se conserve en refrigeración.

Amortiguador de muestra SDS-PAGE 10 mL

	Con -mercaptoetanol	Sin -mercaptoetanol
Tris-HCl 1,25 M pH 6.8	1.25 mL	1.25 mL
Glicerol	2 mL	2 mL
SDS 10%	400 µL	400 µL
-mercaptoetanol	200 µL	-
Azul de Bromofenol	1 mg	1 mg
Agua bidestilada estéril	6.15 mL	6.35 mL

Purificación de proteínas etiquetadas con Histidinas

*Amortiguador de lisis (1L)	*Amortiguador de lisis (1L)	*Amortiguador de lisis (1L)
NaH ₂ PO ₄	NaH ₂ PO ₄	NaH ₂ PO ₄
NaCl	NaCl	NaCl
Imidazol	Imidazol	Imidazol

*Ajustar a pH 8 con NaOH y esterilizar por filtración.

Western-blot para reconocer etiquetas de Histidinas

TTBS, 1L

Trizma base

NaCl

Tween20

Disolver en agua bidestilada y aforar.

Esterilizar en autoclave y conservar a TA.

TTBS, 1L

Trizma base

NaCl

Tween20

Disolver en agua bidestilada y aforar.

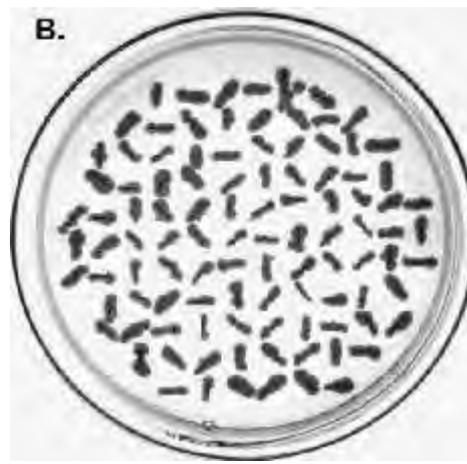
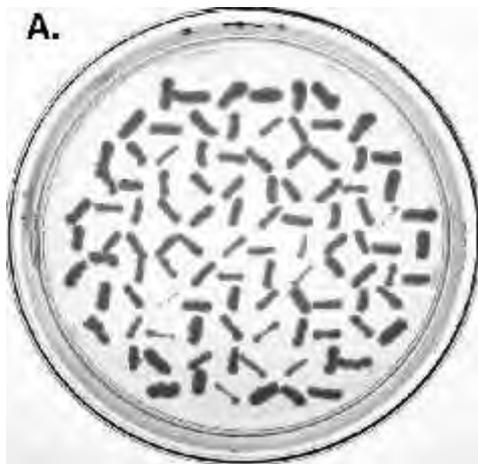
Esterilizar en autoclave y conservar a TA.

Anexo IV Enzimas utilizadas	
HindIII (Invitrogen)	Concentración de stock: 10 U/ μ L
EcoRV (Invitrogen)	Concentración de stock: 10 U/ μ L
BamHI (Invitrogen)	Concentración de stock: 10 U/ μ L
Lisozima	Concentración stock 100 mg/mL
Nucleasa Benzonasa (Sigma, cat. No. E1014-25KU)	Concentración de stock: 250 U/ μ L
Liticasa	Concentración de stock: 2.84mg/mL

Anexo V

pYES2-Tvcks1

pYES2-Tvcks2



pYES2-CKS1

pYES2

pYES2-TvCKS1
His + Leu + Gen

pYES2-TvCKS2
His + Leu + Gen

pYES2-CKS1
His + Leu + Gen

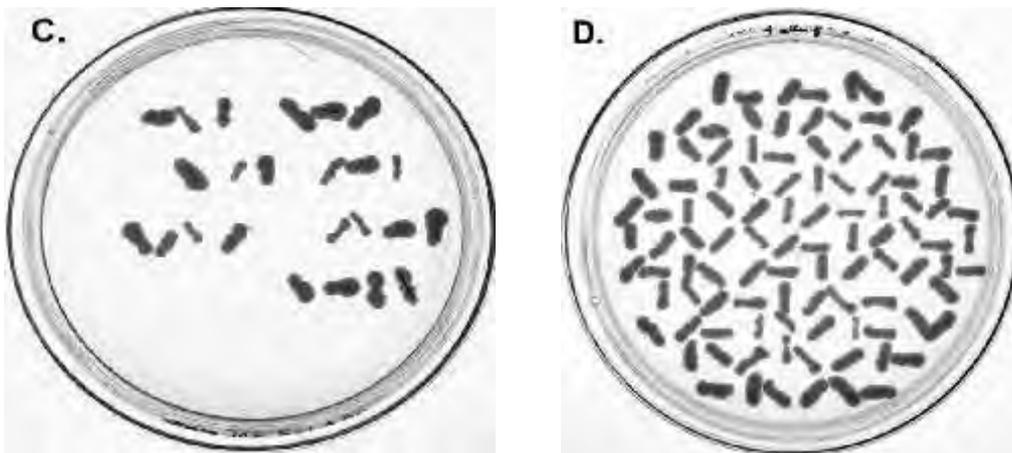


Figura 1. Cultivo en medio rico YPGal/Raf de colonias seleccionadas al azar a partir de la esporulación de la mutante *S. cerevisiae* *CKS1/cks1 ::KanMX* con las construcciones A. pYES2-TvCKS1, B. pYES2-TvCKS2, C. pYES2-CKS1 (control positivo), D. pYES2 (control negativo).

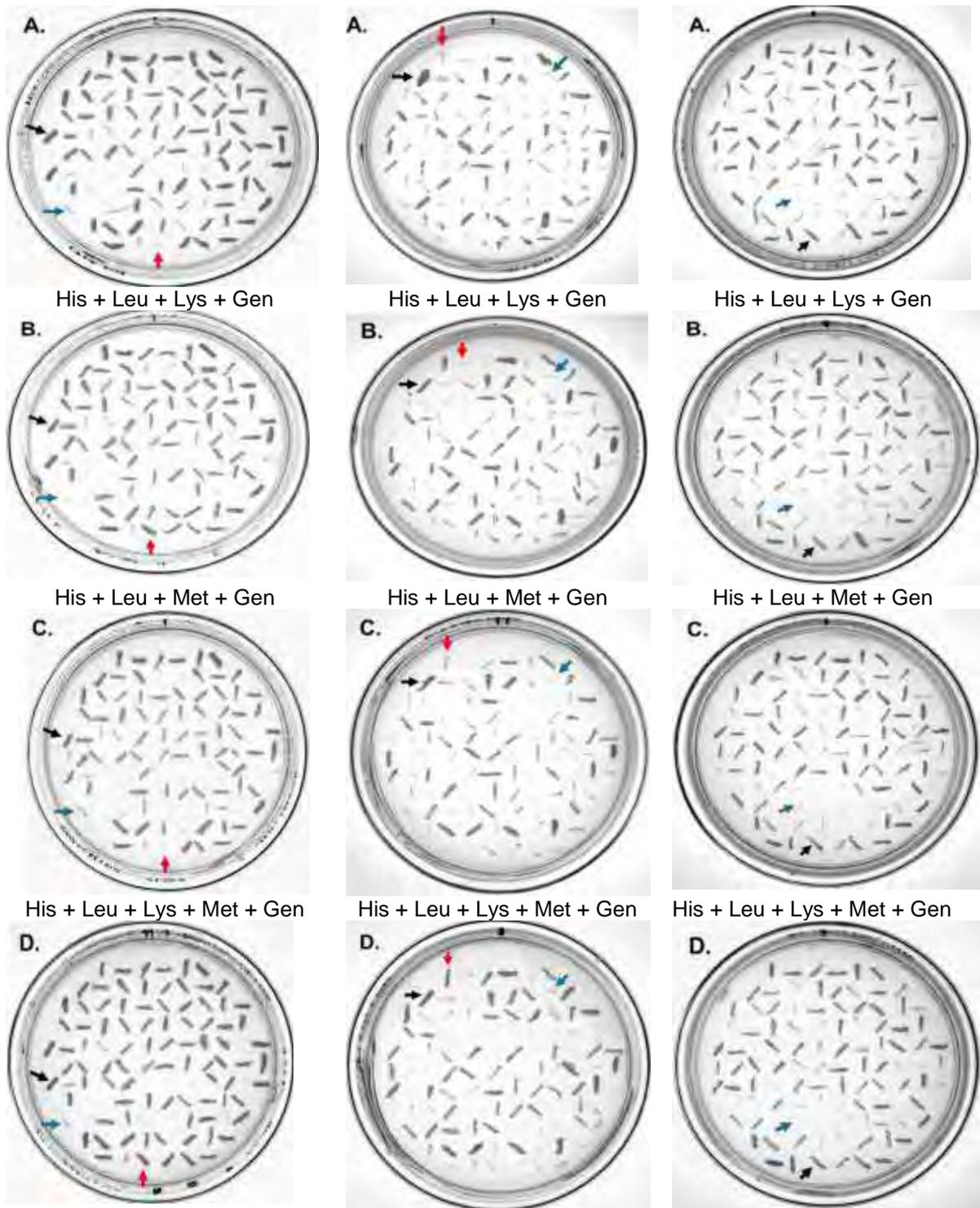


Figura 2. Anexo V. Ensayo de complementación por el método de esporas al azar de las mutantes transformadas con pYES2-*TvCKs1*, pYES2-*TvCKs2* y pYES2 (control negativo). Selección por auxotrofías. Las mutantes fueron cultivadas en Medio Mínimo MM2/Gal/Raf suplementado con diferentes combinaciones de aminoácidos. Las flechas muestran un ejemplo representativo de cada población de células identificada. Flechas rojas: Colonias de células haploides mutantes; Flechas azules: Colonias de células haploides silvestres; Flechas negras: Colonias de células diploides.